

(51) Int.Cl.<sup>6</sup> 識別記号 庁内整理番号 F I  
 A 6 1 K 39/00 ADU H 9284-4C  
 ACS  
 ADY  
 C 0 7 K 14/435 8318-4H

審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 145 頁)

(21) 出願番号 特願平6-505592  
 (86) (22) 出願日 平成5年(1993)8月6日  
 (85) 補正文提出日 平成7年(1995)2月7日  
 (86) 国際出願番号 P C T / U S 9 3 / 0 7 4 2 1  
 (87) 国際公開番号 W O 9 4 / 0 3 2 0 5  
 (87) 国際公開日 平成6年(1994)2月17日  
 (31) 優先権主張番号 0 7 / 9 2 6 , 6 6 6  
 (32) 優先日 1992年8月7日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)  
 (31) 優先権主張番号 0 8 / 0 2 7 , 7 4 6  
 (32) 優先日 1993年3月5日  
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

(71) 出願人 サイテル コーポレーション  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 92121,  
 サンディエゴ, ジョン ホプキンスコート  
 3525  
 (72) 発明者 クボ, ラルフ ティー.  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 92130,  
 サンディエゴ, フツラ ストリート12635  
 (72) 発明者 グレイ, ハワード エム.  
 アメリカ合衆国, カリフォルニア 92037,  
 ラ ジョラ, ラ ジョラ ストリート  
 9068  
 (74) 代理人 弁理士 石田 敬 (外3名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 HLA結合性ペプチド及びその用途

(57) 【要約】

本発明は、特定の H C アレルに特異的に結合する及び M E C アレルにより限定される T 細胞における T 細胞活性化を誘発することのできるペプチド組成物を提供する。このペプチドは所望の抗原に対する免疫応答を誘引するのに有用である。

**【特許請求の範囲】**

1. HLA-A3.2結合性モチーフを有する免疫原性ペプチドを含んで成り、ここでこの免疫原性ペプチドは、約9～約10の残基数を有し、且つN末端からC末端にかけて、下記の残基、即ち、

L, M, I, V, S, A, T, F, C, G, D及びEより成る群から選ばれる第一保存残基；

並びにK, R, Y, H及びFの第二保存残基、

を有しており、

ここでこの第一と第二保存残基は6～7残基隔てられている、

組成物。

3. HLA-A1結合性モチーフを有する免疫原性ペプチドを含んで成り、ここでこの免疫原性ペプチドは、約9～約10の残基数を有し、且つN末端からC末端にかけて、下記の残基、即ち、

T, S及びMの第一保存残基；並びに

D, E, A, S及びTの第二保存残基；

Yの第三保存残基；

を有しており、

ここでこの第一と第二保存残基は隣接し合い、そして第二と第三保存残基は5又は6残基隔てられている、

組成物。

5. HLA-A1結合性モチーフを有する免疫原性ペプチドを含んで成り、ここでこの免疫原性ペプチドは、約9～約10の残基数を有し、且つN末端からC末端にかけて、下記の残基、即ち、

T, S及びMの第一保存残基；並びに

Yの第二保存残基；

を有しており、

ここで第一と第二保存残基は6～7残基隔てられている、

組成物。

7. HLA-A1結合性モチーフを有する免疫原性ペプチドを含んで成り、ここでこの免疫原性ペプチドは、約9～約10の残基数を有し、且つN末端からC末端にかけて、下記の残基、即ち、

D, E, A, S及びTの第一保存残基；並びに

Yの第二保存残基；

を有しており、

ここで第一と第二保存残基は5～6残基隔てられている、

組成物。

9. HLA-A11性モチーフを有する免疫原性ペプチドを含んで成り、ここでこの免疫原性ペプチドは、約9～約10の残基数を有し、且つN末端からC末端にかけて、下記の残基、即ち、

L, M, I, V, A, S, T, G, N, Q, C, F, D, Eの第一保存残基；  
並びに

K, R, Hの第二保存残基；

を有しており、

ここで第一と第二保存残基は6～7残基隔てられている、

組成物。

11. HLA-A24.1合性モチーフを有する免疫原性ペプチドを含んで成り、ここでこの免疫原性ペプチドは、約9～約10の残基数を有し、且つN末端からC末端にかけて、下記の残基、即ち、

Y, F, Wの第一保存残基；並びに

F, I, L, W, Mの第二保存残基；

を有しており、

ここで第一と第二保存残基は6～7残基隔てられている、

組成物。

13. HLA-A3.2結合性モチーフを有する免疫原性ペプチドを含んで成り、この免疫原性ペプチドは7又は10残基数を有し：

第二位にある第一保存残基はA, I, L, M, T及びVより成る群から選ばれ

；そして

C末端の位置にある第二保存残基はK及びRより成る群から選ばれ、

ここでこの第一と第二保存残基は6～7残基隔てられている、

組成物。

14. HLA-A11 結合性モチーフを有する免疫原性ペプチドを含んで成り、ここでこの免疫原性ペプチドは、9又は10の残基数を有し、且つN末端からC末端にかけて、下記の残基、即ち、

N末端から第二の位置にあるA、I、L、M、T及びVより成る群から選ばれる第一保存残基；並びに

C末端にあるKより成る群から選ばれる第二保存残基；

を有しており、

ここで第一と第二保存残基は6～7残基隔てられている、

組成物。

15. 薬理学的に許容される担体とHLA-A3.2結合性モチーフを有する免疫原性ペプチドとを含んで成る薬理組成物であって、ここでこの免疫原性ペプチドは約9～約10の残基数を有し、且つN末端からC末端にかけて、下記の残基、即ち、

L、M、I、V、S、A、T、F、C、G、D及びEより成る群から選ばれる第一保存残基；並びに

K、R及びYの第二保存残基；

を有しており；

ここで第一と第二保存残基は6～7残基隔てられている、

薬理組成物。

16. 薬理学的に許容される担体とHLA-A1結合性モチーフを有する免疫原性ペプチドとを含んで成る薬理組成物であって、ここでこの免疫原性ペプチドは約9～約10の残基数を有し、且つN末端からC末端にかけて、下記の残基、即ち、

T、S及びMの第一保存残基；並びに

D、E、A、S及びTの第二保存残基；

Yの第三保存残基；

を有しており；

ここでこの第一と第二保存残基は1残基、そして第二と第三保存残基は5又は6残基隔てられている、

薬理組成物。

17. 薬理学的に許容される担体とHLA-A1結合性モチーフを有する免疫原性ペプチドとを含んで成る薬理組成物であって、ここでこの免疫原性ペプチドは約9～約10の残基数を有し、且つN末端からC末端にかけて、下記の残基、即ち、

T, S又はMの第一保存残基；並びに

Tyrの第二保存残基；

を有しており；

ここで第一と第二保存残基は6～7残基隔てられている、

薬理組成物。

18. 薬理学的に許容される担体とHLA-A1結合性モチーフを有する免疫原性ペプチドとを含んで成る薬理組成物であって、ここでこの免疫原性ペプチドは約9～約10の残基数を有し、且つN末端からC末端にかけて、下記の残基、即ち、

D, E, S, T第一保存残基；並びに

Yの第二保存残基；

を有しており；

ここで第一と第二保存残基は5～6残基隔てられている、

薬理組成物。

19. 薬理学的に許容される担体とHLA-A24.1結合性モチーフを有する免疫原性ペプチドとを含んで成る薬理組成物であって、ここでこのペプチドは

Y, F, Wの第一保存残基；並びに

F, I, L, W又はmの第二保存残基；

を有しており；

ここでこの第一と第二保存残基は6～7残基隔てられている、

薬理組成物。

20. 免疫原性ペプチドを同定するための方法であって；

所定の MHCクラス I アレルによりエンコードされる MHC 分子についての結合性モチーフを決定する；

結合性モチーフの存在について抗原性タンパク質のアミノ酸配列をスクリーニングする；

結合性モチーフを有する抗原性タンパク質中の配列を選別する，

選別したサブ配列を含んで成る約 8 ～ 約 11 の残基数の試験ペプチドを調製する

；

この試験ペプチドの、所定の MHC アレルに対して結合する能力及び CTL 応答を誘発する能力を決定し、これにより免疫原性ペプチドを同定する；

工程を含んで成る方法。

### 【発明の詳細な説明】

#### HLA結合性ペプチド及びその用途

本願は、USSN 07/926,666 号の一部係属出願である USSN 08/027,746号の一部係属出願である。これらUSSNは引用することで本明細書に組入れる。

#### 発明の背景

本発明はウイルス性障害及び癌の如きの数多くの病理的症状を予防、処置又は診断するための組成物及び方法に関する。特に、本発明は特定の主要組織適合性複合体 (MHC) 分子に結合することができ、且つ免疫応答を誘発することができる新規ペプチドを提供する。

MHC分子はクラス I 又はクラス II分子に分類されている。クラス II MHC分子は免疫応答を開始及び持続することにかかわっている細胞、例えばTリンパ球、Bリンパ球、マクロファージ等の上に主に発現される。クラス II MHC分子はヘルパーTリンパ球により認識され、そしてヘルパーTリンパ球の繁殖及び表示される特定の免疫原性ペプチドに対する免疫応答の増幅を誘発する。クラス I MHC分子はほとんど全ての有機細胞上で発現され、そして細胞障害性Tリンパ球 (CTLs) により認識される。これによりこのTリンパ球はこの抗原担持細胞を破壊する。CTLsは腫瘍拒絶において、及びウイルス感染症との戦いにおいて特に重要である。CTLは、完全な外来抗原自体よりはむしろ、MHCクラス I 分子に結合したペプチドフラグメントの形態における抗原を認識する。この抗原は通常は細胞により内生的に合成されねばならず、そしてこのタンパク質抗原の一部は細胞質の中で小さなペプチドフラグメントへと分解される。これら

の小さなペプチドの一部はブレイゴルジ区画に移動し、そしてクラス I 重鎖と相互作用して適正な折りたたみ及び $\beta$ 2ミクログロブリンサブユニットとの会合を助長する。このペプチド-MHCクラス I 複合体は次いで発現及び特異的な CTLによる潜在的な認識のために細胞表層へと送られる。

ヒト MHCクラス I 分子HLA-A2.1の結晶構造の調査は、クラス I 重鎖の $\alpha$ 1及び $\alpha$ 2ドメインの折りたたみによりペプチド結合性溝 (groove) が作られることを示唆している (Bjorkmanら、Nature329: 506 (1987))。しかしながら、これら

の調査において、溝に結合するペプチドの種類は決定されていない。

Buusら、Science 242: 1065 (1988) は最初に MHCからの結合ペプチドの酸性溶離のための方法を述べている。その後、Rammensee及びその協同研究者は(Falkら、Nature 351: 290 (1991)) はクラス I 分子に結合した天然プロセスを受けたペプチドを特定する手法を開発した。その他の研究者は、質量分析法により Bタイプ(Jardetzkyら、Nature 353: 326 (1991)) 及びA2.1タイプ(Huntら、Science 225: 1261 (1992)) のクラス I 分子から溶離させたペプチドの、慣用の自動配列決定による、様々なHPLC画分中のより豊富なペプチドの直接的なアミノ酸配列決定の成功を収めている。MHCクラス I における天然にプロセスを受けたペプチドの特徴の所見については

Rötzschke 及びFalk(Rötzschke and Falk, Immunol. Today 12: 447 (1991) に紹介されている。

Setteら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3296 (1989) は、MHC結合性能力を推定するのに MHCアレル特異性モチーフを利用できることを示している。Schaefferら、Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 4649 (1989) は MHC結合が免疫原性に関係していることを示している。幾人かの著者(De Bruijnら、Eur. J. Immunol., 21: 2963-2970

(1991); Pamerら、991 Nature 353: 852-955 (1991)) は、クラス I 結合性モチーフを動物モデルにおける潜在的な免疫原性ペプチドの同定に応用できうる予備的な証拠を提供している。一定のクラス I アイソタイプの多数のヒトアレルに対して特異的なクラス I モチーフはまだ開示されていない。このような異なるアレルの組合せ頻度は、ヒト異系交配集団の大部分又はおそらくは過半数を包括するほど十分に高いべきことが所望される。

当業界における開発にもかかわらず、従来技術はこの研究を基礎とする有用なヒトペプチドベースワクチン又は治療剤を供していない。本発明はこれら及びその他の利点を提供する。

#### 発明の概要

本発明は MHCクラス I 分子に対する結合性モチーフを有する免疫原性ペプチド



を含んで成る組成物を提供する。この免疫原性ペプチドは一般に約8～約11残基数であり、そして適当な MHCアレルによりエンコードされる結合性タンパク質にかかわる保存残基を含んで成る。

例えば、HLA-A3.2に関するモチーフは、N末端からC末端に至るまで、2位においてのL, M, I, V, S, A, T及びFの第一保存残基並びにC末端においてのK, R又はYの第二保存残基を含んで成る。その他の第一保存残基はC, G又はD、そして他にEである。その他の第二保存残基はH又はFである。第一と第二保存残基とは好ましくは6～7残基離れている。

HLA-A1に関するモチーフは、N末端からC末端に至るまで、T, S又はMの第一保存残基、D又はEの第二保存残基、及びYの第三保存残基を含んで成る。その他の第二保存残基はA, S又はTである。第一及び第二保存残基は隣接しており、そして好ましくは6～

7残基で第三保存残基と離れている。第二モチーフはE又はDの第一保存残基及びYの第二保存残基より成り、ここで第一と第二保存残基とは5～6残基離れている。

HLA-A11に関するモチーフは、N末端からC末端に至るまで、2位においてのT又はVの第一保存残基及びKのC末端保存残基を含んで成る。この第一と第二保存残基とは好ましくは6又は7残基離れている。

HLA-A24.1に関するモチーフは、N末端からC末端に至るまで、2位においてのY, F又はWの第一保存残基及びF, I, W, M又はLのC末端保存残基を含んで成る。この第一と第二保存残基とは6～7残基離れている。

いくつかの潜在的な標的タンパク質上のエピトープがこの方法で同定されうる。適当な抗原の例には、前立腺特異性抗原 (PSA)、B型肝炎コア及び表層抗原 (HBVc, HBVs)、C型肝炎抗原、悪性黒色腫抗原 (MAGE-1)、エプスタイン・バーウイルス抗原、ヒト免疫不全1型ウイルス (HIV1) 及びパピロマウイルス抗原が含まれる。これらのペプチドは従って生体内及び生体外の両方における治療及び診断用途にとっての薬理組成物において有用である。

定義

「ペプチド」なる語は、本明細書においては「オリゴペプチド」と同義語で、一連の残基、典型的にはL-アミノ酸であって、互いと、典型的には隣り合うアミノ酸のアルファアミノ基とカルボニル基との間でのペプチド結合によって連結し合っているものを意味するために用いている。本発明のオリゴペプチドは長さにおいて約15残基未満であり、そして通常は約8～約11残基、好ましくは9又は10残基より成る。

「免疫原性ペプチド」とは、アレル特異性モチーフを含んで成り、従ってMHCアレルと結合し、そしてCTL応答を誘発することのできるペプチドである。従って、免疫原性ペプチドは適当なクラスI MHC分子に結合することができ、そして免疫原性ペプチドが起源とする抗原に対する細胞障害性T細胞応答を誘発することができる。

「保存残基」とは、ペプチドモチーフ中の特定の位置においてランダム分布により予測されるであろうものよりも有意に高い頻度において認められるアミノ酸である。典型的には、保存残基は、それにおいて免疫原性ペプチドがMHC分子との接点を供しうるものである。規定の長さのペプチド内の1～3、好ましくは2の保存残基が免疫原性ペプチドについてのモチーフを規定する。これらの残基は典型的にはペプチド結合溝と密着しており、ここでその側鎖は溝自体の特定のポケットの中に埋まっている。典型的には、免疫原性ペプチドは3まで保存残基、より通常には2の保存残基を含んで成るであろう。

本明細書において用いている「ネガティブ結合性残基」とは、ペプチド内に適切な保存残基が存在しているにもかかわらず、それが一定の位置にあるとしたならば非結合因子又は弱結合因子であるペプチドをもたらすであろう、換言すればCTL応答を誘発することのないペプチドをもたらすであろうアミノ酸である。

「モチーフ」なる語は、特定のMHCアレルにより認識される、規定の長さ、通常は約8～約11のアミノ酸のペプチドにおける残基のパターンを意味する。このペプチドモチーフは典型的には各ヒトMHCアレルに関して異なり、そして保存性の高い残基のパターンにおいて相違する。

アレルに関する結合性モチーフは精度の度合いの上昇と共に特定されうる。あ

るケースにおいては、保存残基は全てペプチドの中の

適正な位置に存在しており、そしてネガティブな結合性残基はない。

「単離」又は「生物学的に純粋」なる表現は、その天然状態において認められる通常付随している成分を実質的に又は本質的に含まない物質を意味する。従って、本発明のペプチドはインシトウ (insitu) の環境において通常結合している物質、例えば抗原表示細胞上のMHC I 分子を含まない。たとえタンパク質が均質又は主要バンドに至るまで単離されても、所望のタンパク質と一緒に精製されてしまう5~10%の範囲の天然タンパク質の微量夾雑物がある。本発明の単離ペプチドはかかる内生共精製タンパク質を含まない。

「残基」なる語は、アミド結合又は擬アミド結合によりオリゴペプチドの中に組み込まれたアミノ酸又は擬アミノ酸を意味する。

図面の簡単な説明

図1はHLA-A精製法の流れ図である。

図2は、プロテインA-Sepharoseに結合させたmAb GAP A3で調製したアフィニティーカラムを用いての細胞系EIMからのアフィニティー精製したHLA-A3.2のSDS-PAGE分析である。

レーン1-分子量標準品。

レーン2-A3.2酸性溶離物

レーン3-A3.2第二酸性溶離物

レーン4-塩基溶離#1

レーン5-塩基溶離#2

レーン6-濃縮塩基溶離#1

レーン7-濃縮塩基溶離#2

レーン8-BSA-10 $\mu$ g

レーン9-BSA-3 $\mu$ g

レーン10-BSA-1 $\mu$ g

図3はHLA-A3酸性溶離ペプチドの逆相高性能液体クロマトグラフィー (RP-HPLC)

Q)を示す。

図4は%結合放射活性により測定した、MHC分子に対する本発明の放射活性ラベル化ペプチドの結合性を示す。

図5は3種のペプチド〔Hbc 18-27 (924.07)、前立腺特異性抗原ペプチド (939.01) 及びHIV nef 73-82 (940.03)〕の存在下でのMHC分子に対する本発明のペプチドの結合の阻害を示す。

図6は $\beta$ 2ミクログロブリンの存在下又は非存在下でのMHC濃度に基づく結合性の依存性を示す。

図7は未ラベルペプチドの添加を伴う結合性の投与量依存性阻害を示す。

図8は6nMの見かけ上の $K_D$ を確認する、MHC A11に対する結合性のスキッチャード分析。

図9は%結合反応性により測定した、MHC A1に対する本発明の放射活性ラベル化ペプチドの結合性を示す。

図10は未ラベルペプチドの添加を伴う結合性の投与量依存性阻害を示す。

図11は21nMの見かけ上の $K_D$ を確認する、MHC A1に対する結合性のスキッチャード分析。

図12は%結合反応性により測定した、MHC A24の濃度の関数としての本発明の2つのペプチドの結合性を示す。

図13は未ラベルペプチドの添加を伴う、MHC A24に対する結合性の投与量依存性阻害を示す。

図14は30及び60nMそれぞれを確認する、2つのペプチドのMHC A24に対する結合性のスキッチャード分析を示す。

図15は、 $\beta$ 2ミクログロブリンのMHCクラスI分子に及ぼす作用及び特定のペプチドの酸ストリップPIAプラストに及ぼす作用を示す。

図16は、777.03-924.07-927.32ペプチドプールの負荷された (loaded) GC43 A 2.1応答体及び自己酸ストリップ化PBMCs又はPIAプラストを用いるCTL誘発を示す。

図17は1044.04-1044.05-1044.06ペプチドプールを負荷した後のX351又はX355 A2.1応答体及び自己酸ストリップ化PBMCs又はPHAプラストを用いるCTL誘発を示す。

図18は939.03ペプチドを負荷した後の刺激因子としてのGC49 A2.1応答体及び自己酸ストリップ化PHAプラストを用いるCTL誘発を示す。

図19はペプチド938.01の負荷後の刺激因子としてのGC66 A1応答体及び自己酸性ストリップ化PBMCsを用いるCTL誘発を示す。

図20はMAGE3ペプチドを負荷したSAC-I活性化PBMCsによる刺激を経たペプチド感作化標的及び内因性標的の溶解を示す。

図21は酸ストリップ負荷と低温インキュベーションとの対比を示す。

図22はMAGE/A11に関する免疫原性ペプチドに対するCTL応答を示す。

図23はHIV/A3に関する免疫原性ペプチドに対するCTL応答を示す。

図24はHCV/A3に関する免疫原性ペプチドに対するCTL応答を示す。

図25はHBV/A1に関する免疫原性ペプチドに対するCTL応答を示す。

好適な態様の詳細

本発明はヒトクラス I MHC (時折りHLAと呼ぶ) アレルサブタイ

プに関するアレル特異性ペプチドモチーフの決定に関する。これらのモチーフは任意の所望の抗原、特にヒトウイルス性障害又は癌にかかわるものに由来するT細胞エпитープであって、それに関する潜在的な抗原標的のアミノ酸配列が公知であるものを特定するのに利用できる。

いくつかの潜在的な標的タンパク質上のエпитープがこの方法で同定できうる。適切な抗原の例には、前立腺特異性抗原 (PSA)、B型肝炎コア及び表層抗原 (HBVc, HBVs)、C型肝炎抗原、エプスタインバーウィルス抗原、黒色腫抗原 (例えばMAGE-1)、パピロマウイルス (HPV) 抗原が含まれる。

これらのエпитープを含んで成るペプチドを合成し、次いで適当なMHC分子に対するその結合能力について、例えば、精製クラス I 分子及び放射性ヨウ素化ペプチド並びに／又はエンブティー (空の) クラス I 分子を用いるアッセイ、例えば免疫蛍光染色及びフローマイクロフローロメトリー、ペプチド依存性クラス

I 集成アッセイ、並びにペプチド競合によるCTL認識の阻害で、試験する。クラス I 分子に結合するこれらのペプチドを、潜在的な治療剤としての、感染又は免疫化個体に由来するCTLsにとっての標的として働くその能力、及びウイルス感染化標的細胞又は腫瘍細胞と反応することのできるCTL集団を発生せしめうる一次インビトロ又はインビボCTL応答を誘発するその能力について更に評価する。

MHCクラス I 抗原はHLA-A,B及びC遺伝子座によりエンコードされる。HLA-A及びB抗原は細胞表層においてほぼ同等の密度において発現され、一方、HLA-Cの発現は有意に低い（おそらくは10分の1）。これらの遺伝子座それぞれはいくつかのアレルを有する。

本発明のペプチド結合性モチーフは各アレルのサブタイプに対して相対的に特異性である。

ペプチドベースワクチンに関して、本発明のペプチドは好ましくはヒト集団において幅広い分布を有するMHC I 分子により認識されるモチーフを含んで成る。MHCアレルは異なる人種群及び民族において異なる頻度で認められるため、標的MHCアレルの選択は標的集団に基づきうる。表1は様々な民族間でのHLA-A遺伝子座産物での様々なアレルの頻度を示す。例えば、コーカサス人の集団の過半数は4種のHLA-Aアレルサブタイプ、詳しくはHLA-A2.1,A1,A3.2及びA24.1に結合するペプチドにより包括されうる。同様に、アジア人の集団の過半数は5番目のHLA-A1.2に結合するペプチドの追加で包括されうる。

表 1

A アレル／サブタイプ	N (69)*	A (54)	C (502)
A1	10.1(7)	1.8(1)	27.4(138)
A2.1	11.5(8)	37.0(20)	39.8(199)
A2.2	10.1(7)	0	3.3(17)
A2.3	1.4(1)	5.5(3)	0.8(4)
A2.4	—	—	—
A2.5	—	—	—
A3.1	1.4(1)	0	0.2(0)
A3.2	5.7(4)	5.5(3)	21.5(108)
A11.1	0	5.5(3)	0
A11.2	5.7(4)	31.4(17)	8.7(44)
A11.3	0	3.7(2)	0
A23	4.3(3)	—	3.9(20)
A24	2.9(2)	27.7(15)	15.3(77)
A24.2	—	—	—
A24.3	—	—	—
A25	1.4(1)	—	6.9(35)
A26.1	4.3(3)	9.2(5)	5.9(30)
A26.2	7.2(5)	—	1.0(5)
A26V	—	3.7(2)	—
A28.1	10.1(7)	—	1.6(8)
A28.2	1.4(1)	—	7.5(38)
A29.1	1.4(1)	—	1.4(7)
A29.2	10.1(7)	1.8(1)	5.3(27)
A30.1	8.6(6)	—	4.9(25)
A30.2	1.4(1)	—	0.2(1)
A30.3	7.2(5)	—	3.9(20)
A31	4.3(3)	7.4(4)	6.9(35)
A32	2.8(2)	—	7.1(36)
AW33.1	8.6(6)	—	2.5(13)
AW33.2	2.8(2)	16.6(9)	1.2(6)
AW34.1	1.4(1)	—	—
AW34.2	14.5(10)	—	0.8(4)
AW36	5.9(4)	—	—

表はB. DuPont, Immunobiology of HLA, Vol. I, Histocompatibility Testing 1987, Springer-Verlag, New York 1989より集計。

\* N＝ニグロ人；A＝アジア人；C＝コーカサス人。かっこ内の数字は分析に含まれる個体数を表わす。

ペプチド化合物を説明するために用いる命名法は慣用の習慣に従っており、それにおいてはアミノ基を各アミノ酸残基の左側（N－末端）、そしてカルボキシル基をその右側（C－末端）に示している。本発明の特定の選ばれた態様を示す式においては、そのアミノ

末端基及びカルボキシル末端基は、特に示していないが、何らかのことわりのない限り、生理学的pHにおいてそれらが帯びるであろう形態にある。アミノ酸構造

式において、各残基は一般に標準の3文字又は1文字表示により表わしている。L-型のアミノ酸残基は大文字1文字により、又は3文字記号の最初の文字の大文字により表わされ、そしてそのD-型は小文字1文字により、又は3文字記号の最初の文字の小文字により表わされる。グリシンは不斉炭素原子を有さず、そして単に「Gly」又はGで称している。

本発明のペプチドを同定するために用いる手順は一般に、引用することで本明細書に組入れるFalkらのNature 351:290 (1991) に開示の方法に従う。簡単には、この方法はMHCクラスI分子の、典型的には適当な細胞又は細胞系からの免疫沈殿又はアフィニティークロマトグラフィーによる大量スケール単離を包括する。当業者に同等に知られる所望のMHC分子の単離のためのその他の方法の例にはイオン交換クロマトグラフィー、レクチンクロマトグラフィー、サイズ排除、高性能リガンドクロマトグラフィー、及び上記の技術全ての組合せが含まれる。

特定のMHC分子、特にMHCクラスI分子を有する数多くの細胞が知られ、そして容易に入手できる。例えば、ヒトEBV形質転換B細胞系はクラスI及びクラスII MHC分子の分取単離にとつての優れた起源であることが知られている。よく特性化された細胞系が私的及び商業的起源、例えばアメリカン タイプ カルチャー コレクション (「Catalogue of Cell Lines and Hybridomas」第6版 (1988) Rockville, Maryland, U.S.A) ; ナショナル インスティテュートオブ ゼネラル メディカル サイエンス 1990/ 1991 Catalog of Cell Lines (NIGMS) ; ヒューマン ジェネティック ミュータント セル レポジトリ、Camden, NJ ; 及びASHIレポジトリ、

ビングハム アンド ウォメンズ ホスピタル、75 Francis Street, Boston, MA 02115より入手できる。表2はHLA-Aアレルにとつての起源として利用するのに適当ないくつかのB細胞系を挙げている。これらの細胞系は全て大型バッチの中で増殖でき、それ故 MHC分子の大量生産にとつて有用である。当業者は、これらは単なる代表的な細胞系であり、そして数多くのその他の細胞起源が採用されうること認識しているであろう。HLA-B及び HLA-Cに対してホモ接合性の類似のEBV B細胞系が HLA-B及び HLA-Cアレルそれぞれにとつての起源として働きう



る。

表 2  
ヒト細胞系(HLA-A起源)

HLA-Aアレル	B細胞系
A1	MAT COX (9022) STEINLIN (9087)
A2.1	JY
A3.2	EHM (9080) H0301 (9055) GM3107
A24.1	KT3 (9107), TISI (9042)
A11	BVR (GM6828A) WT100 (GM8602), WT52 (GM8603)

典型的なケースにおいては、免疫沈殿を所望のアレルに単離するために用いる。使用する抗体の特異性に応じて数多くのプロトコルが使用されうる。例えば、アレル-特異性 mAb試薬はHLA-A、HLA-B及び HLA-C分子のアフィニティー精製のために使用できうる。HLA-A分子の単離のためにいくつかのmAb試薬が入手できる(表3)。従って、標的化HLA-Aアレルそれぞれに関して、HLA-A分子の直接的な単離のために利用することのできる試薬が入手できる。標準の

技術を用いてこれらの mAbで調製されたアフィニティークラムは関連の HLA-Aアレル産物を精製するのに効果的に利用される。

アレル特異性 mAbに加えて、広域反応性抗-HLA-A,B,C mAbs、例えばW6/32及び B9.12.1、並びに一の抗-HLA-B,C mAb,B1.23.2が、下記の実施例の章に記載の他のアフィニティー精製プロトコルに利用できうる。

表 3  
抗 体 試 薬

抗-HLA	名 称
HLA-A1	12/18
HLA-A3	GAPA3 (ATCC, HB122)
HLA-11, 24.1	A11.1M (ATCC, HB164)
HLA-A, B, C	W6/32 (ATCC, HB95)
モノ形態	B9.12.1 (INSERM-CNRS)
HLA-B, C	B.1.23.2 (INSERM-CNRS)
モノ形態	

単離 MHC分子のペプチド結合性溝に結合したペプチドは酸処理を利用して一般に溶離される。ペプチドは様々な標準変性手段、例えば熱、pH、清浄剤、塩、カオトロピック剤又はそれらの組合せによりクラス I 分子から解離することもできる。

ペプチド画分を逆相高性能液体クロマトグラフィー (HPLC) によりMHC分子から更に分離させ、そして配列決定する。ペプチドは当業者によく知られている様々なその他の標準手段、例えば濾過、限外濾過、電気泳動、サイズクロマトグラフィー、特異的な抗体による沈殿、イオン交換クロマトグラフィー、等電点電気泳動等により分離されうる。

単離ペプチドの配列決定は標準の技術、例えばエドマン分解により実施されうる (Hunkapiller, M.W.ら、Methods Enzymol. 91,399 [1983])。配列決定にとって適当なその他の方法には、従来から述べられている個々のペプチドの質量分析配列決定が含まれる (Huntら、Science 225:1261 (1992)、これは引用することによって本明細書に組入れる)。様々なクラス I 分子由来のバルクの異種ペプチド (例えばプールしたHPLC画分) のアミノ酸配列決定は典型的には各クラス I アレルにとっての特徴的な配列モチーフを示す。

種々のクラス I アレルに特異的なモチーフの特定は、アミノ酸配列のわかって

いる抗原性タンパク質由来の潜在的なペプチドエпитオプの同定を可能にする。典型的には、潜在的なペプチドエпитオプの同定は、まずモチーフの存在について、所望の抗原のアミノ酸配列をスキャンするコンピューターを使用して行われる。エпитオプの配列を次に合成する。MHCクラス分子に結合する能力は様々な異なる方法で測定される。一の手段は下記の実施例10に記載のクラス I 分子結合アッセイである。文献に記載されているその他の択一的方法には、抗原表示 (Setteら、J.Immunol. 141:3893(1991))、インビトロ集成アッセイ (Townsendら、Cell 62:285(1990)) 及び突然変異 eITIsを用いる FACSベースアッセイ、例えば RMA-S (Meliefら、Eur.J.Immunol. 21:2963(1991)) が含まれる。

次に、MHCクラス I 結合アッセイにおいて試験陽性であるペプチドを、インビトロで、特異的な CTL 応答を誘発するペプチドの能力についてアッセイする。例えば、ペプチドとインキュベートした抗原表示細胞は、応答細胞集団における CTL 応答を誘発する能力についてアッセイされうる。抗原表示細胞は正常細胞、例えば末梢血液単核細胞又は樹状細胞 (Inabaら、J.Exp.Med. 166:182(1987); Boog, Eur.J.Immunol. 18:219 [1988]) でありうる。

他方、クラス I 分子に内部プロセスを受けたペプチドを負荷する能力を欠く突然変異哺乳動物細胞系、例えばマウス細胞系 RMA-S

(Kärreら、Nature 319: 675 (1986); Ljunggrenら、Eur.J.Immunol. 21:2963-2970(1991)) 及び人体 T 細胞ハイブリドーマ、T-2 (Cerundoloら、Nature 345:449-452(1990))、並びに適当なヒトクラス I 遺伝子でトランスフェクトされたものが、インビトロで一次 CTL 応答を誘発するペプチドの能力について試験するために、それにペプチドを加えるとき、好適に利用される。使用できうるその他の真核細胞系には様々な昆虫細胞系、例えば蚊の幼虫 (ATCC細胞系 CCL 125,126,1660,1591,6585,6586)、蚕 (ATCC CRL 8851)、行列うじ (ATCC CRL 1711)、蛾 (ATCC CCL 80) 及びしょうじょうばえ細胞系、例えばシュナイダー (Schneider) 細胞系 (Schneider J.Embryol.Exp.Morphol. 27:353-365(1927)) が含まれる。それらは、適当なヒトクラス I MHC アレルをエンコードする遺伝

子及びヒト  $\beta 2$  ミクログロブリン遺伝子でトランスフェクトされている。

末梢血液リンパ球は好都合には、正常ドナー又は患者の単純な静脈穿刺又は白血球搬送に従って好適に単離され、そして CTL 前駆体の応答細胞起源として使用される。一の態様において、適当な抗原表示細胞を、無血清培地中の  $10 \sim 100 \mu\text{M}$  のペプチドと、適当な培養条件下で4時間インキュベートする。このペプチド負荷した抗原表示細胞を次にインビトロで7~10日間、最適培養条件下で応答細胞集団とインキュベートする。陽性 CTL 活性化は、放射性ラベル化標的細胞、即ち、特異的なペプチドをパルスした標的、並びにペプチド配列が由来する関連のウイルス又は腫瘍抗原の内性プロセスを受けた形態を発現する標的細胞の両者を殺菌す CTL の存在について培養物をアッセイすることにより決定できうる。

CTLの特異性及び MHC制限は、適切な又は不適切なヒト MHCクラ

スIを発現する様々なペプチド標的細胞に対して試験することにより決定される。MHC結合アッセイにおいて試験陽性であり、且つ特異的な CTL 応答を発生せしめるペプチドを本明細書において免疫原性ペプチドと呼んでいる。

免疫原性ペプチドは合成的に、もしくは組換え DNA工学的に調製されうるか、又は天然起源、例えば完全ウイルスもしくは腫瘍から単離されうる。このペプチドはその他の天然の宿主細胞タンパク質及びそのフラグメントを実質的に含まないことが好ましいが、しかしながら一部の態様においては、このペプチドは天然フラグメント又は粒子に合成的に抱合されうる。このポリペプチド又はペプチドは様々な長さであってよく、その天然（無帯電）形態又は塩の形態のいずれかでもよく、そして改質、例えばグリコシル化、側鎖酸化もしくはリン酸化を含んでいないか、又はこれらの改質を、その改質が本明細書に記載のポリペプチドの生物活性を破壊しないことを条件として含んでよい。

所望するには、このペプチドは可能な限り小さく、同時に、大型のペプチドの生物活性全てを実質的に保持し続ける。可能ならば、本発明のペプチドを、細胞表層上の MHCクラスI分子に結合している内生プロセスを受けたウイルス性ペプチド又は腫瘍細胞ペプチドとサイズにおいてつり合った9又は10のアミノ酸残基の長さへと最適化することが所望される。

所望の活性を有するペプチドは、一定の所望の性質、例えば向上した薬理的特徴を供し、同時に未改質ペプチドの所望の MHC 分子に結合する及び適当な T 細胞を活性化させる生理学的活性を高める又は少なくとも実質的にその全てを維持するように必要なだけ改質してよい。例えば、これらのペプチドは様々な改変、例えば置換（保存的又は非保存的）にかけてよく、この場合、かかる改変はその用

途において一定の利点、例えば向上した MHC 結合性を供しうる。保存的置換とは、あるアミノ酸残基を、生物学的及び／又は化学的に類似の別のものと交換すること、例えばある疎水性残基を別のもの、又はある極性残基を別のものと交換することをいう。この置換には、Gly, Ala; Val, Ile, Leu, Met; Asp, Glu; Asn, Gln; Ser, Thr; Lys, Arg ; 及び Phe, Tyr の如きの組合せが含まれる。単一のアミノ酸置換は D-アミノ酸を用いて行ってもよい。かかる改質は公知のペプチド手順、例えば引用することで本明細書に組入れる、

Merrifield, Science 232:341-347 (1986) , Barany と Merrifield, The Peptides, Gross and Meienhofer 編 (N.Y. Academic Press) 頁 1-284 (1979) ; 及び Stewart と Young, Solid Phase peptide Synthesis, (Rockford, Ill., Pierce) 第 2 版 (1984) に記載の手順を用いて行われうる。

これらのペプチドはその化合物のアミノ酸配列を伸ばす又は減らすことにより、例えばアミノ酸の付加又は欠失により改質させてもよい。本発明のペプチド又は類似体は一定の残基の順序又は組成を変えることにより改質することもでき、生物学的活性にとって必須の一定のアミノ酸残基、例えば重要な接触部位にあるもの又は保存残基は、生物学的活性に悪影響を及ぼすことなく一般に改変することができないことは容易に理解されるであろう。重要でないアミノ酸はタンパク質中の天然のもの、例えば L- $\alpha$ -アミノ酸又はその D-異性体に限らず、非天然アミノ酸、例えば  $\beta$ - $\gamma$ - $\delta$ -アミノ酸、及び L- $\alpha$ -アミノ酸の数多くの誘導体が含まれうる。

典型的には、単一のアミノ酸置換を有する一連のペプチドを、結合に及ぼす静電荷、疎水性等の作用を決定するために採用する。例えば、一連の正帯電した（例えば Lys 又は Arg）又は負帯電した（例えば Glu）アミノ酸置換を、様々な MHC 分

## 子及びT細胞レセプター

に対して種々の感受性パターンを示しているペプチド伝いに施す。更に、小さな、比較的中性な成分、例えばAla, Gly, Pro又は類似の残基を用いる多重置換を採用してよい。これらの置換はホモオリゴマー又はヘテロオリゴマーであってよい。置換又は付加する残基の数及び種類は、必須の接点間の間隔及び期待する一定の機能的性質（例えば疎水性、対、親水性）に依存する。親ペプチドの親和性に比しての、MHC分子又はT細胞レセプターに対する高められた結合親和性も、かかる置換によって達し得る。あらゆる状況において、かかる置換は、結合性を破壊しうる例えば立体及び帯電障害を回避するように選ばれるアミノ酸残基又はその他の分子フラグメントを採用すべきである。

アミノ酸置換は典型的には単一残基とする。置換、欠失、挿入又は任意のそれらの組合せを最終ペプチドにおいて現れるように組合せてよい。置換変異体はペプチドのうちの少なくとも一残基が除去され、そしてその場所に別の残基が挿入されているものである。かかる置換は、ペプチドの特徴を適当に調節することを所望するとき、一般には下記の表4に従って行う。

表 4

<u>もとの残基</u>	<u>典型的な置換</u>
Ala	ser
Arg	lys
Asn	gln ; his
Asp	glu
Cys	ser
Gln	asn
Glu	asp
Gly	pro
His	asn ; gln
Ile	leu ; val
Leu	ile ; val
Lys	arg
Met	leu ; ile
Phe	met ; leu ; tyr
Ser	thr
Thr	ser
Trp	tyr
Tyr	trp ; phe
Val	ile ; leu

機能（例えば、MHC分子又はT細胞レセプターに対する親和性）の実質的な変更は、表4におけるものより保存性の低い置換を選ぶ、即ち、（a）置換領域におけるペプチド骨格の構造、例えばシートもしくはヘリックスコンホメーション、（b）標的部位での分子の帯電もしくは疎水性、又は（c）側鎖のかさ高さ、の維持に及ぼすその効果においてより有意に異なる残基を選ぶことによりなされる。

一般にはペプチドの特性において最大の変更をもたらすものと予測される置換は、（a）親水性残基、例えばセリルを（により）疎水性残基、例えばロイシル、

イソロイシル、フェニルアラニル、バリルもしくはアラニルに(を)置換する；  
 (b) 正電側鎖を有する残基、例えばリシル、アルギニルもしくはヒスチジルを  
 (により)、負電側鎖を有する残基、例えばグルタミルもしくはアスパルチルに  
 (を)置換する；又は(c) かさ高い側鎖を有する残基、例えばフェニルアラニ  
 ンを(により)、側鎖を有さないもの、例えばグリシンに(を)置換する、もの  
 であろう。

これらのペプチドは免疫原性ペプチドの中に2以上の残基の同配体(isostere)  
 )も含んで成りうる。ここで定義する同配体とは、2以上の残基数の配列であつ  
 て、第二配列を置換することのできる配列であり、なぜならこの第一の配列の立  
 体コンホメーションが第二配列に特異的な結合部位に整合するからである。この  
 語は特に、当業者によく知られているペプチド骨格改質を含む。かかる改質には  
 アミド窒素、 $\alpha$ -炭素、アミドカルボニルの改質、アミド結合の完全交換、伸長  
 、欠失又は骨格架橋が含まれる。一般にはSpatola, Chemistry and Biochemistry  
of Amino Acids, peptides and Proteins, Vol. VII (Weinstein編, 1983) を参照  
 のこと。

様々な擬アミノ酸又は非天然アミノ酸によるペプチドの改質はインビボでのペ  
 プチドの安定性を高めるうえで特に有用である。安定性は数多くの方法でアッセ  
 イされる。例えば、ペプチダーゼ及び様々な生物学的媒体、例えば血漿及び血  
 清が安定性を試験するのに用いられている。例えば、Verhoefら、Eur. J. Drug Me  
tab Pharmacokin. 11 : 291-302 (1986) を参照のこと。本発明のペプチドの半  
 減期は25%のヒト血清(v/v)アッセイを用いて慣用的に決定される。このプ  
 ロトコールは一般に下記の通りである。プール

したヒト血清(AB型、非熱不活性化)を使用前に遠心により脱脂する。次にこの  
 血清をRPMI組織培養培地で25%にまで希釈し、そしてペプチドの安定性を試験す  
 るために用いる。所定の時間間隔において、少量の反応溶液を取出し、そして6  
 %の水性トリクロロ酢酸又はエタノールに加える。濁った反応サンプルを15分間  
 冷やし(4℃)、次いで沈殿した血清タンパク質をペレットにするために遠心す  
 る。次に、ペプチドの存在を逆相HPLCにより、安定-特異的なクロマトグラフィ



一条件を利用して決定する。

本発明のペプチド又は CTL 刺激活性を有するその類似体は、向上した半減期以外の所望の性質を供するように改質してよい。例えば、CTL 活性を誘発するペプチドの能力は、T ヘルパー細胞応答を誘発することのできる少なくとも一のエピトープを含む配列への結合によって高めることができる。特に好適な免疫原性ペプチド/T ヘルパーコンジュゲートはスペーサー分子を介して連結させる。このスペーサーは典型的には比較的小さい天然分子、例えばアミノ酸又は擬アミノ酸であって、生理的条件下で実質的に無帯電であるものを含んで成る。これらのスペーサーは典型的には例えばAla,Gly又はその他の非極性のアミノ酸もしくはは中性の極性のアミノ酸の中性スペーサーより選ばれる。任意的に存在しているスペーサーは同一の残基より成っている必要はなく、従ってヘテロー又はホモオリゴマーでありうる。存在しているとき、このスペーサーは通常少なくとも1又は2の残基数、より通常には3～6の残基数であろう。他方、CTLペプチドはスペーサー抜きでTヘルパーペプチドに連結されていてよい。

免疫原性ペプチドを、CTLペプチドのアミノ又はカルボキシ末端のいずれかに直接又はスペーサーを介してTヘルパーペプチドに連結してよい。免疫原性ペプチド又はTヘルパーペプチドのアミノ末

端はアシル化してよい。

一定の態様においては、本発明の薬理組成物の中にCTLを感作するのに補助する少なくとも一の成分を含ませることが所望されうる。脂質はウィルス性抗原に対してインビボでCTLを感作することを補助できる因子として同定されている。例えば、パルミチン酸残基をLys 残基のアルファー及びエプシロンアミノ基に付加し、次いで例えば1又は複数の連結残基、例えばGly,Gly-Gly,Ser,Ser-Ser、等を介して免疫原性ペプチドに連結させる。脂質付加ペプチドを次に、ミセル形態で直接的に、リポソームの中に含ませて、又は不完全フロイドアジュバントの如きのアジュバントの中に乳化させて注射してよい。好適な態様において、特に有効な免疫原は、免疫原性ペプチドのアミノ末端にSer-Serの如きの連結を介して付加されている Lys のアルファー及びエプシロンアミノ基に付加されたバル

ミチン酸を含んで成る。

CTL応答の脂質感作の別の例として、E. coli (E.coli) リポタンパク質、例えばトリパルミトイル-S-グリセリルシステインリセリルセリン ( $P_3CSS$ ) が、適当なペプチドに共有結合させているとき、ウィルス特異性 CTLを感作するのに用いることができる。引用することで本明細書に組入れる Deresら、Nature 342:561-564 (1989) を参照のこと。例えば本発明のペプチドは  $P_3CSS$ に複合させてよく、そして標的抗原に対する CTL応答を特異的に感作するために個体にそのリポペプチドを投与してよい。更に、中和用抗体の誘発も適当なエピトープを表示するペプチドに抱合された  $P_3CSS$ で感作することができるため、これらの2つの組成物を、感染に対する体液及び細胞媒介型応答をより効果的に誘発するように組合せることができる。

更に、追加のアミノ酸をペプチドの末端に付加して、ペプチド同

志の連結のし易さ、担体支持体もしくは大型のペプチドへのカップリング、ペプチドもしくはオリゴペプチドの物理的もしくは化学的性質の改質、等を供することができる。アミノ酸、例えばチロシン、システイン、リジン、グルタミン酸又はアスパラギン酸等を、ペプチド又はオリゴペプチドのC-又はN-末端に導入してよい。あるケースにおいてはC末端の改質はペプチドの結合特性を変えてしまいうる。更に、ペプチド又はオリゴペプチドの配列は、天然配列とは、末端  $NH_2$  アシル化により、例えばアルカノイル ( $C_1-C_{20}$ ) 又はチオグリコイルアセチル化、末端-カルボキシルアミド化 (例えばアンモニア、メチルアミン等) により改質されていることで異なりうる。ある状況において、これらの改質は支持体又はその他の分子に対する連結のための部位を担いうる。

本発明のペプチドは様々な方法で調製できうる。その比較的小さなサイズを理由に、これらのペプチドは慣用の技術に従って溶液中又は固相支持体上で合成されうる。様々な自動合成装置が市販され、そして公知のプロトコールに従って利用されうる。例えば Stewartと Young, Solid Phase Peptide Synthesis、第2版、Pierce Chemical Co. (1984) 前掲を参照のこと。

他方、組換え DNA工学を採用してよく、この場合、課題の免疫原性ペプチドをエ

ンコードするスクレオチド配列を発現ベクターの中に挿入し、適当な宿主細胞に形質転換又はトランスフェクトし、そして発現にとって適当な条件下で培養する。これらの手順は当業界に一般に知られ、一般には引用することで本明細書に組入れる Sambrook ら、Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, New York (1982) に記載されている。従って、本発明の 1 又は複数のペプチド配列を含んで成る融合タンパク質を適当な T 細胞エピトープを提供するために使用できる。

ここで考慮する長さのペプチドについてのコード配列は化学技術、例えば Matteucci ら J. Am. Chem. Soc. 103:3185 (1981) のホスホトリエステル法により合成できうため、改質は適当な塩基で天然ペプチド配列をエンコードするものを置換することにより簡単に行われうる。次にコード配列に適当なリンカーを施し、そして当業界において一般に入手できる発現ベクターにリゲートし、そしてそのベクターを所望の融合タンパク質を作るために適当な宿主を形質転換するのに使用する。数多くのかかるベクター及び適当な宿主系が現在入手できる。融合タンパク質の発現のためには、コード配列には、作動連結した開始及び終止コドン、プロモーター及びターミネーター領域、並びに通常は所望の細胞性宿主の中での発現のための発現ベクターを供するように複製系が施されている。例えば、細菌宿主と適合性なプロモーター配列を、所望のコード配列の挿入のために好都合な制限部位を含むプラスミドの中に供する。得られる発現ベクターを適当な細菌宿主に形質転換させる。むろん、酵母又は哺乳動物細胞宿主も、適当なベクター及びコントロール配列を採用しながら利用してよい。

本発明のペプチド並びにその薬理及びワクチン組成物はウィルス感染症及び癌を処置及び／又は予防するために哺乳動物、特にヒトに投与するのに有用である。本発明の免疫原性ペプチドを利用して処置できうる障害の例には前立腺癌、B 型肝炎、C 型肝炎、AIDS、腎細胞癌、頸部癌、リンパ腫、CMV 及び尖圭コンジローム症が含まれる。

薬理組成物に関して、本発明の免疫原性ペプチドは癌で既に苦しんでいる、又は課題のウィルスで感染した個体に投与する。感染症の潜伏期又は急性期におけ

る者は個別に、又は適宜その他の処置と一緒に免疫原性ペプチドで処置できうる。治療の用途においては、

組成物はウイルス又は腫瘍抗原に対する効果的なCTL応答を誘発するのに、並びに症状及び／又は合併症を治療又は少なくとも軽減するのに十分な量で患者に投与する。これを成し遂げるのに適当な量を「治療的に有効な投与量」と定義する。この用途にとって有効な量は例えばペプチドの組成、投与方法、処置すべき障害の段階及び重症度、患者の体重及び一般的な健康状態、並びにかかりつけの医師の判断に依存するであろうが、しかし一般には、70kgの体重の患者に関して約 $1.0\mu\text{g}$ ～約 $5000\mu\text{g}$ のペプチドに範囲する初期免疫（即ち、治療的又は予防的投与）、それに続く患者の血液における比CTL活性を測定することを介する患者の応答及び状態に依存して数週間から数ヶ月にわたる、ブースト療法に依存して約 $1.0\mu\text{g}$ ～約 $1000\mu\text{g}$ のペプチドのブースト投与量に範囲する。本発明のペプチド及び組成物は一般に重症な障害症状、即ち生命を脅やかす又は潜在的に生命を脅やかす状況において採用されうることを念頭に置かねばならない。かかるケースにおいては、外来物質の最少限化、及びこのペプチドの比較的無毒な性質の観点において、実質的に過剰なこれらのペプチド組成物を投与することを処置医師は可能であり、且つ所望すると感じるであろう。

治療の用途にとっては、投与はウイルス感染症の最初の徴候において、又は腫瘍の検査もしくは外科除去において、又は急性感染症の場合は診断の直後において開始すべきである。これに、症状が少なくとも実質的に和らぐまで、且つその後一定期間までブースト投与を続ける。慢性感染症においては、負荷投与、それに続くブースト投与が必要とされうる。

本発明の組成物による感染個体の処置は急性感染個体における感染症の消散を早めうる。慢性感染症に進行し易い（又はかかり易い）個体にとって、この組成物は急性から慢性感染症に至る進行を阻止

する方法において特に有用である。感受性の個体が感染前又は感染中に例えばここに記載の通りに同定された場合、この組成物をそれを標的とすることができ、

大集団に投与する必要性が最少限となる。

このペプチド組成物は慢性感染症の処置のため及びキャリアー中のウィルス感染細胞を排除するように免疫系を刺激するためにも利用できうる。細胞障害性T細胞応答を効果的に刺激するのに十分な量の製剤中の免疫相刺激ペプチド及び投与方法を提供することが重要である。従って、慢性感染症の処置にとって、代表的な用量は、70kgの患者にとって一回の投与当り約 $1.0\mu\text{g}$ ～約 $5000\mu\text{g}$ 、好ましくは約 $5\mu\text{g}$ ～ $1000\mu\text{g}$ に範囲する。免疫投与、それに続く樹立された間隔、例えば1～4週間でのブースト投与が、おそらくは個体を有効に免疫するために長期間にわたって必要とされる。慢性感染症においては、投与は、臨床症状又は実験室検査が、ウィルス感染症が排除されたか又は実質的に緩和されたことを示唆するまで、及びその後の一定期間まで少なくとも続けるべきである。

治療の処置のための薬理組成物は非経口、塗布、経口又は局所投与を意図する。好ましくは、この薬理組成物は非経口的に、例えば静脈内的に、皮下的に、皮内的に、又は筋肉内的に投与する。従って、本発明は、許容担体、好ましくは水性担体の中に溶解又は懸濁されている免疫原性ペプチドの溶液を含んで成る非経口投与用組成物を提供する。様々な水性担体、例えば水、緩衝水、0.9%の食塩水、0.3%のグリシン、ヒアルロン酸等が使用される。これらの組成物は慣用のよく知られた滅菌技術により滅菌されるか、又は滅菌濾過される。得られる水性溶液はそのまま使用するように包装するか、又は凍結乾燥してよく、凍結乾燥調製品は投与前に滅菌溶液と組合せる。この組成物は必要ならば生理条件に近づけるための薬理学的に許容されている補助物質、例えばpH調整剤及び緩衝剤、

毒性調節剤、湿潤剤等、例えば酢酸ナトリウム、乳酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、ソルビタンモノラウレート、トリエタノールアミンオレートを含みうる。

薬理製剤中の本発明のCTL刺激ペプチドの濃度は大幅に変えてよく、即ち、約0.1重量%未満から、通常は約2重量%以上から、20～50重量%、又はそれより大に変えてよく、そしてそれは主に流体容量、粘度等により、選ばれた投与の特

定の態様に従って選ばれる。

本発明のペプチドはリボソームを介して投与してもよく、リボソームはペプチドを特定の組織、例えばリンパ組織に狙い打ちさせるのに働くか、又は感染細胞を特異的に狙い打ちさせ、更にペプチド組成物の半減期を長くする。リボソームにはエマルジョン、フォーム、ミセル、不溶性単層、液晶、リン脂質分散体、ラメラ層等が含まれる。これらの調製品において、輸送すべきペプチドはリボソームの一部として、単独で、又は例えばリンパ球細胞にわたって広がるレセプターに結合する分子と、例えばCD45抗原に結合するモノクローナル抗体と、又はその他の治療的もしくは免疫原性組成物と一緒に組込まれる。即ち、所望の本発明のペプチドの詰まったリボソームは、リンパ球細胞の部位に導かれることができ、そこにリボソームは選ばれた治療的／免疫学的ペプチド組成物を導入する。本発明において利用するリボソームは標準の小胞体形成脂質より形成され、これは一般に中性及び負帯電リン脂質とステロール、例えばコレステロールとを含む。脂質の選択は一般に例えばリボソームのサイズ、酸不安定性及び血液中でのリボソームの安定性を考慮して導かれる。様々な方法がリボソームを調製するのに有用であり、例えば引用することで本明細書に組入れる、Szokaら、Ann.Rev.Biophys .Bioeng. 9:467 (1980)、米国特許第4,235,871、4,501,728、4,837,028及び5,019,369号に記載されている。

免疫細胞を狙い打ちするため、リボソームの中に組込みリガンドには、例えば所望の免疫系細胞の細胞表層決定基に特異的な抗体又はそのフラグメントが含まれうる。ペプチドを含むリボソーム懸濁物には静脈内的に、局所的に、塗布的に、等により、とりわけ投与の方法、導入すべきペプチド、及び処置すべき障害の段階に従って変わる投与量で投与されうる。

固形組成物に関して、慣用の無毒の固形担体が使用でき、これには例えば薬理級のマンニトール、ラクトース、デンプン、ステアリン酸マグネシウム、サッカリンナトリウム、タルカム、セルロース、グルコース、スクロース、炭酸マグネシウム等が含まれる。経口投与のためには、薬理学的に許容される無毒の組成物は、任意の通常採用されている賦形剤、例えば先に挙げた担体と、一般には10~

95%の、そしてより好ましくは25%~75%の活性成分、即ち、1又は複数種の本発明のペプチドとを一体化させることにより作られる。

エアゾール投与のためには、この免疫原性ペプチドは好ましくは界面活性剤及び噴射剤と一緒に細く分割した形態で供給する。ペプチドの典型的なパーセンテージは0.01~20重量%、好ましくは1~10重量%である。むしろ界面活性剤は無毒でなくてはならず、そして好ましくは噴射剤中で可溶性である。かかる試薬の代表は6~22個の炭素原子を含む脂肪酸、例えばカプロン酸、オクタノン酸、ラウリン酸、パルミチン酸、ステアリン酸、リノール酸、リノレニン酸、オレステリン酸及びオレイン酸と、脂肪式多価アルコール又はその環状無水物とのエステル又は半エステルである。混合エステル、例えば混合又は天然グリセリドを使用してよい。この界面活性剤はこの組成物の0.1~20重量%、好ましくは0.25~5重量%を構成しうる。この組成物の残りを通常は噴射剤とする。所望するならば、経鼻導入のためのレシチンの如き、担体をも含ませてよい。

別の観点において、本発明は、活性成分として本明細書に記載の免疫学的に有効な量の免疫原性ペプチドを含むワクチンに向けられている。このペプチドは宿主、例えばヒトに、それ自体の担体に結合させておいて、又は活性ペプチド単位のリポリマー又はヘテロポリマーとして導入することができる。かかるポリマーは免疫反応を高める長所と、そのポリマーを作るのに種々のペプチドを使用しているときは、ウイルス又は腫瘍細胞の種々の抗原決定基と反応する抗体及び/又はCTLを誘発する追加の能力とを有する。有用な担体は当業界によく知られており、そして例えばチログロブリン、アルブミン、例えば牛血清アルブミン、破傷風毒素、ポリアミノ酸、例えばポリ(リジン：グルタミン酸)、B型肝炎ウイルスコアタンパク質、B型肝炎ウイルス組換えワクチン等が含まれる。このワクチンは生理学的に寛容(許容)されている希釈剤、例えば水、リン酸緩衝食塩水、又は食塩水も含み、そして更に典型的にはアジュバントを含む。アジュバント、例えば不完全フロイドアジュバント、リン酸アルミニウム、水酸化アルミニウム又はみょうばんが当業界においてよく知られている物質である。更に、上記した通り、CTL応答は本発明のペプチドを脂質、例えば $P_3$  CSSに抱合させること

により感作させることができる。本明細書に記載のペプチド組成物による、注射、エアゾール、経口、経皮又はその他のルートを経しての免疫により、宿主の免疫系は所望の抗原に対して特異的な大量の CTL を産生することによりそのワクチンに応答し、そしてその宿主はその後の感染に対して少なくとも部分的に免疫されるか、又は慢性感染症の進行に耐性となる。

本発明のペプチドを含むワクチン組成物をウイルス感染症又は癌にかかり易い又はそうでなければその危険性にある患者に投与して、抗原に対する免疫応答を誘発させ、そしてこれによって患者自身の

免疫応答能力を高める。かかる量を「免疫学的に有効な量」と定義する。この用途において、ここでもその正確な量は患者の健康状態及び体重、投与態様、製剤の種類等に依存するが、しかしながら一般には70kgの患者当たり約 $1.0\mu\text{g}$ ～約 $5000\mu\text{g}$ 、より通常には70kgの体重当たり約 $10\mu\text{g}$ ～約 $500\mu\text{g}$ に範囲する。

ある状況においては、本発明のペプチドワクチンを、課題のウイルス、特にウイルスエンベロープ抗原に対して応答する中和抗体と組合せることが所望されうる。

治療的又は免疫化の目的のためには、本発明のペプチドは弱毒化ウイルス宿主、例えばワクシニア又は伝染性上皮腫ウイルスにより発現させることもできる。この手法は、本発明のペプチドをエンコードするヌクレオチド配列を発現させるためのベクターとしてのワクシニアウイルスの利用を包括する。急性もしくは慢性感染宿主、又は未感染宿主への導入により、組換ワクシニアウイルスは免疫原性ペプチドを発現し、それ故宿主 CTL 応答を誘発する。

免疫プロトコールにおいて有用なワクシニアベクター及び方法は、例えば引用することで本明細書に組入れる米国特許第4,722,848号に記載されている。他のベクターはBCG (Bacille Calmette Guerin) である。BCGベクターは引用することによって本明細書に組入れるStoverら (Nature 351:456-460 (1991)) を参照のこと。本発明のペプチドの治療的投与又は免疫化にとって有用な幅広い様々なその他のベクター、例えばサルモネラ チフィ (*Salmonella typhi*) ベクター等は、本明細書より当業者にとって明らかとなるであろう。



抗原性ペプチドは同様に生体外で CTL を誘発するのに使用できうる。得られる CTL は、他の慣用の治療様式では応答しない、又はペプチドワクチン治療手法に  
 応答しないであろう患者の慢性感染症（ウイルス性又は細菌性）又は腫瘍を処置  
 するのに利用できうる。

特定の病原体（感染因子又は腫瘍抗原）に対する生体外 CTL 応答は、組織培養に  
 おいて患者の CTL 前駆細胞 (CTLp) を、抗原表示細胞 (APC) の起源及び適当な  
 免疫抗原性ペプチドとインキュベートすることにより誘発させる。CTLp が活性化さ  
 れ、そして成熟し、そしてエフェクター CTL へと増殖する適当なインキュベシ  
 ョン時間後（典型的には 1 ~ 4 週間）、それらの細胞を患者に戻し注入し、そこ  
 でこれらはその特異的な標的細胞（感染細胞又は腫瘍細胞）を破壊するであろう  
 。特異的な細胞障害性 T 細胞の発生のためのインビトロ条件を最適化するため、  
 刺激細胞の培養物を適当な無血清培地の中に維持する。

刺激細胞を、活性化すべき細胞、例えば CD8<sup>+</sup> 前駆細胞とインキュベートする  
 前に、抗原性ペプチドを刺激細胞培養物に、刺激細胞の表層上に発現されるヒト  
 クラス I 分子の上にそれが負荷されるに十分な量で加える。本発明において、十  
 分な量のペプチドとは、約 200、そして好ましくは 200 以上のヒトクラス I MHC  
 分子が、各刺激細胞の表層上に発現されるペプチドで負荷される量をいう。好ま  
 しくは、この刺激細胞は  $>20 \mu\text{g}/\text{ml}$  のペプチドとインキュベートする。

休止又は前駆 CD8<sup>+</sup> 細胞を次に培養物の中で、適当な刺激細胞と、CD8<sup>+</sup> 細胞を  
 活性化させるに十分な時間にわたってインキュベートする。好ましくは、CD8<sup>+</sup>  
 細胞は抗原特異的な様式で活性化させる。 休止又は前駆 CD8<sup>+</sup>（エフェクター  
 ）細胞、対、刺激細胞の比は、個体間で変わりうるものであり、そして更には培  
 養条件に対するその個体のリンパ球の適合性、並びに障害の症状の種類及び重症  
 度、又は記載の処置様式を使用する条件の如きの変化に依存しうる。しかしなが  
 ら、好ましくは、リンパ球：刺激細胞の比は約 30：1 ~ 300：1 の範囲とする。  
 エフェクター／刺激培養物は、治療的に有

用又は有効な数の CD8<sup>+</sup> 細胞を刺激するのに必要な時間維持する。

インビトロでの CTLの誘発は、APC上のアレル特異的 MHCクラス I 分子に結合しているペプチドの特異的な認識を必要とする。APC当りの特異的 MHC/ペプチド複合体の数は、CTLの刺激、特に一次免疫応答において重要である。細胞当たり少量のペプチド/MHC複合体が細胞を CTLによる溶解を受け易くするのに、又は二次 CTL応答を刺激するのに十分であるが、一次応答中での CTL前駆体 (pCTL) の有効な活性化は有意に多量な MHC/ペプチド複合体を必要とする。細胞上のエンブティーな主要組織適合性複合分子のペプチド負荷は一次細胞障害性Tリンパ球応答の誘発をもたらす。細胞上のエンブティーな主要組織適合性複合分子のペプチド負荷は一次細胞障害性Tリンパ球応答の誘発を可能にする。

突然変異細胞系は全てのヒト MHCアレルに存在していないため、APCの表層から内性 MHC結合化ペプチドを除去し、次いで得られるエンブティーな MHC分子に課題の免疫原性ペプチドを負荷する技術を利用するのが好都合である。非形質転換 (非腫瘍原性)、非感染細胞、そして好ましくは患者の自己細胞の APCとしての利用が、生体外 CTL療法の開発に向けられている CTL誘発プロトコルのデザインにとって所望される。本願は APCから内性 MHC結合化ペプチドをストリップ (脱離) し、次いで所望のペプチドを負荷する方法を開示する。

安定な MHCクラス I 分子は下記の要素より成る三量複合体である：1) 通常8~10残基数のペプチド、2)  $\alpha$  1及び $\alpha$  2ドメインにおいてペプチド結合性部位を抱えているトランスメンブラン多形性タンパク質重鎖、並びに3) 非共有結合した非多形性軽鎖、 $\beta$  2ミクログロブリン。この複合体から結合ペプチドを除去及び/又は $\beta$  2ミクログロブリンを解離することは、MHCクラス I 分子を非機能性

に、且つ不安定にし、迅速分解をもたらす。PBMCから単離したMHCクラス I 分子全てに内生ペプチドが結合している。従って、第一段階は、APC上の MHCクラス I 分子に結合している全ての内生ペプチドを、外生ペプチドを加える前に、それを壊すことなく除去することにある。

MHCクラス I 分子を結合ペプチドから解放する二通りの考えられる方法には、 $\beta$  2ミクログロブリンを不安定化するために培養温度を一夜かけて37℃から26℃

に下げること、及び温和な酸処理を利用して細胞から内生ペプチドをストリップすることが含まれる。この方法は既に結合しているペプチドを細胞外環境へと放出させ、新たな外生ペプチドがそのエンブティーなクラス I 分子に結合することを可能にする。低温インキュベーション法は外生ペプチドが MHC 複合体に効率的に結合することを可能にするが、26℃での一夜のインキュベーションを必要とし、これは細胞の代謝率を遅めうる。勢力的に MHC 分子を合成しない細胞（例えば休止 PBMC）は低温手順によっては大量のエンブティーな表層 MHC 分子を供しないであろう。

苛酷な酸ストリップには、トリフルオロ酢酸、pH2 によるペプチドの抽出、又は免疫アフィニティー精製したクラス I ペプチド複合体の酸変性が含まれる。これらの方法は CTL 誘発にとっては可能でなく、なぜなら内生ペプチドを除去し、同時に抗原表示にとって重要である APC の生存及び最適な代謝状態を保持することが重要だからである。グリシン又はクエン酸-リン酸バッファの如きの pH 3 の温和な酸性溶液が、内生ペプチドを同定するために、及び腫瘍結合化 T 細胞エビトープを同定するために使用される。この処理は、MHC クラス I 分子のみが不安定となり（従って結合ペプチドが遊離する）、一方、MHC クラス II 分子を含むその他の表層抗原が完全のままである点で特に有効である。最も重要には、温和な酸溶液によ

る細胞の処理は細胞の生存率又は代謝状態に影響を及ぼさない。この温和な酸処理は迅速であり、なぜなら内生ペプチドのストリップは 4℃で 2 分において起こり、そして APS は適当なペプチドを負荷した後にその機能を発揮する準備ができているからである。この技術はここでは一次抗原特異的 CTL の発生のためのペプチド特異的 CTL を作るのに利用されている。得られる APC はペプチド特異的 CD8<sup>+</sup> CTL を誘発するうえで有効である。

活性化 CD8<sup>+</sup> 細胞は様々な公知の方法のどれかを利用して刺激細胞から効率的に分離することができうる。例えば、刺激細胞に対して、刺激細胞上に負荷したペプチドに対して、又は CD8<sup>+</sup> 細胞に対して特異的なモノクローナル抗体（又はそのフラグメント）を、その適当な補体リガンドを結合せしめるために利用して

よい。次に抗体標識分子を適当な手段を介して、例えばよく知られている免疫沈殿又はイムノアッセイ法を介して、刺激-エフェクター細胞混合物から抽出してよい。

活性化 $CD8^+$ 細胞の効果的な細胞障害性の量はインビトロ及びインビボ用途間で、並びにこれらのキラー細胞の究極的な標的である細胞の量及び種類により変わりうる。その量は患者の症状に依存しても変わり、そして医師による全ての適当な要因の考慮を通じて決定されるべきである。しかしながら、好ましくは約 $1 \times 10^6$ ～約 $1 \times 10^{12}$ 、より好ましくは約 $1 \times 10^6$ ～約 $1 \times 10^{11}$ 、そして更により好ましくは約 $1 \times 10^6$ ～約 $1 \times 10^{10}$ の活性化 $CD8^+$ 細胞を成人に利用し、対比してマウスにおいては約 $5 \times 10^6$ ～ $5 \times 10^7$ の細胞を利用する。

好ましくは、前述の通り、活性化 $CD8^+$ 細胞は細胞培養物より、処置すべき個体への $CD8^+$ 細胞の投与前に回収する。しかしながら、その他の現状の及び提唱されている処置様式と異なり、本法は腫瘍

原性でない細胞培養系を使用することを認識しておくことが重要である。従って、もし刺激細胞を活性化 $CD8^+$ 細胞の完璧な分離が達せない場合でも、少ない数の刺激細胞の投与に関して知られている。固有の危険性はなく、一方、哺乳動物腫瘍促進性細胞の投与は非常に有害でありうる。

細胞成分の再導入法は当業界に知られ、そして米国特許第4,844,893号Hookら及び米国特許第4,690,915号 Rosenbergに例示の如きの手順が含まれる。例えば、静脈内点滴を介しての活性化 $CD8^+$ 細胞の投与が適当である。

本発明の免疫原性ペプチドはモノクローナル抗体を作るのにも利用できる。かかる抗体は有効な診断又は治療剤として有用でありうる。

これらのペプチドは診断試薬としても有用でありうる。例えば、本発明のペプチドは、このペプチド又は近縁のペプチドを採用する処置療法に対する特定の個体の感受性を決定するのに使用することができ、それ故現存の処置プロトコルを改良するうえで、又は冒されている個体にとっての予後を決定するうえで役立つ。更に、このペプチドは慢性感染症に進行する実質的な危険性にあるであろう個体を推測するのに利用されもする。

下記の実施例は例示であって限定のために提示するのではない。

## 実施例 1

### クラス I 抗原の単離

HLA-A<sub>2</sub>抗原精製法の流れ図を図 1 に示す。簡単には、適当なアレルを抱えている細胞を大量バッチ（6～8 リットル； $\sim 5 \times 10^9$  細胞を生み出す）で増殖させ、遠心により回収し、そして洗った。全ての細胞系を、10%の胎児牛血清（FBS）及び抗生物質の添加した RPMI 1640 培地の中に維持しておいた。大量スケール培養物のため、

細胞を 10% の FBS 又は 10% のウマ血清及び抗生物質を有する RPMI 1640 の中でローラーボトル培養で増殖させた。細胞は 259 ローターの付いた IEC-CRV 5000 遠心機による 1500 RPM の遠心によって回収し、そしてリン酸緩衝食塩水 PBS（0.01 M の  $\text{PO}_4$ 、0.154 M の NaCl、pH 7.2）で 3 回洗った。

細胞をペレットにし、そして  $-70^\circ\text{C}$  で保管するか、又は清浄剤リゼートを調製するために清浄剤溶解溶液で処理した。細胞リゼートはストック清浄剤溶液〔1%の NP-40（sigma）又は Renex 30（Accurate Chem. Sci. Corp., Westbury, NY 11590）、150 mM の NaCl、50 mM の トリス、pH 8.0〕の、細胞ペレット（予めカウント済み）への、清浄剤溶液の ml 当り  $50 \sim 100 \times 10^6$  細胞の比での添加により調製した。プロテアーゼインヒビターのカクテルを予め測定しておいた容量のストック清浄溶液に、細胞ペレットへの添加の直前に加えた。プロテアーゼインヒビターカクテルの添加は下記の最終濃度をもたらした：フェニルメチルスルホニルフルオリド（PMSF）2 mM；アプロチニン  $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；ロイペプチン  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；ペプスタチン  $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ ；ヨードアセトアミド  $100 \mu\text{M}$ ；及び EDTA  $3 \text{ng}/\text{ml}$ 。細胞溶解は  $4^\circ\text{C}$  で 1 時間、定期的に混合して進行させた。通常  $5 \sim 10 \times 10^9$  の細胞を  $50 \sim 100 \text{ml}$  の清浄剤溶液の中で溶解させた。このリゼートを  $4^\circ\text{C}$  で  $15,000 \times g$  で 30 分間の遠心、及び上清画分の  $0.2 \mu$  のフィルターユニット（Nalgene）へのその後の通過によって清澄化した。

HLA-A<sub>2</sub>抗原の精製は、mAb-コンジュゲート化 Sepharose ビーズにより調製したアフィニティーカラムを用いて成し遂げた。抗体製造のため、細胞を大型組織培

養フラスコ (Corning 25160-225) の中で10%の FBSを有するRPMI中で増殖させた。抗体を清澄組織培養培地から、硫酸アンモニウム分画、それに続くプロテインA-Sepharose (Sigma) 上でのアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。

簡単には、飽和硫酸アンモニウムを、攪拌しながらゆっくりとこの組織培養上清液に45% (容量、対、容量) に至るまで加えて4℃で一夜イムノグロブリンを沈殿させた。その沈殿タンパク質を10000×gで30分の遠心により回収した。次いでこの沈殿物を最少容量のPBSに溶かし、そして透析チューブ (Spectro/Por 2, Mol.wt. カットオフ値12,000~14,000; Spectrum Medical Ind.) に移し入れた。透析はPBS (タンパク質溶液の容量の $\geq 20$ 倍) に対して、4℃で24~48時間に行ったり、4~6回透析バッファーを交換しながら行った。透析したタンパク質溶液を遠心により (10,000gで30分) 清澄化し、そしてその溶液のpHを1NのNaOHでpH 8.0に調整した。プロテインA-Sepharose (Sigma) をその製造者の仕様書に従って水和し、そしてプロテインA-Sepharoseカラムを用意した。10mlベクトル容量のカラムは一般に50~100mgのマウスIgGを結合せしめる。

タンパク質サンプルは、大量の装填容量に関してはペリスタルポンプを、又は少量 (<100ml) に関しては重力を利用してプロテインA-Sepharose カラムに載せた。そのカラムを数倍容量のPBSで洗い、そして溶出物を光度計によりA<sub>280</sub>で基底線に達するまでモニターした。結合抗体は適当なpHの0.1Mのクエン酸 (1NのNaOHで適当なpHに調整) を用いて溶離させた。マウスIgG-1に関しては、pH 6.5を使用し、IgG2aに関してはpH 4.5を使用し、そしてIgG2b及びIgG3に関してはpH 3.0を使用した。2Mのトリスベースを溶離物を中和するために用いた。抗体を含む画分 (A<sub>280</sub>によりモニター) をブールし、PBSに対して透析し、そしてAmicon Stirred Cellシステム (Amicon Model 8050; YM30膜付き) を用いて更に濃縮した。抗-A2 mAb, BB7.2、及び抗-A3 mAb, GAP3がアフィニティー精製にとって特に有用である。

HLA-A抗原はmAb-コンジュゲートをSepharoseビーズで準備し

たアフィニティークラムを用いて精製した。このアフィニティークラムはプロテイン-A-Sepharoseビーズ (Sigma) を上記の通りにアフィニティー精製 mAbとインキュベートすることにより準備した。ビーズのml当り 5~10mgの mAbが好適な比である。mAb結合ビーズを硼酸バッファー (硼酸バッファー: 100mMの四硼酸ナトリウム, 154mMの NaCl, pH 8.2) で、洗浄液がA<sub>280</sub>で基底線を示すまで洗った。200mMのトリエタノールアミン中のジメチルピペリジデート (20mM) を、結合mAbをプロテイン-A-Sepharoseに共有架橋させるために加えた (Schneiderら, J. Biol. Chem. 257:10766(1982))。ローテーター上で室温において45分インキュベートした後、過剰な架橋剤は、そのビーズを10~20mlの20mMのエタノールアミン、pH 8.2で洗うことにより除去した。各洗浄の間、そのスラリーをローテーター上に室温で5分間載せておいた。そのビーズを硼酸バッファー及び PBS+ 0.2%のアジ化ナトリウムで洗った。

次いで細胞リゼート (5~10×10<sup>6</sup> 細胞当量) を5~10mlのアフィニティークラムにゆっくり通し (0.1~0.25ml/分の流速)、固定化抗体にその抗原を組合させた。そのリゼートをカラムに通した後、そのカラムを順に20カラム容量の清浄剤ストック溶液+ 0.1%のドデシル硫酸ナトリウム、20カラム容量の 0.5Mの NaCl、20mMのトリス、pH 8.0、及び10カラム容量の20mMのトリス、pH 8.0で洗った。mAbに結合した HLA-A<sub>2</sub>抗原を塩基性バッファー溶液 (水中の50mMのジエチルアミン) で溶離させた。別の方法として、酸性溶液、例えば0.15~0.25Mの酢酸も結合抗原を溶離させるために用いた。溶離物のアリコート (1/50) を、比色アッセイ (BCAアッセイ、Pierce) もしくはSDS-PAGEのいずれか、又は両者を利用するタンパク質定量のために取出した。SDS-PAGE分析はLaemmli (Laemmli, U. K., Nature 227:680(1970)) に記載の通りにして、既知量の牛血清アルブミ

ン (Sigma) をタンパク質標準品として使用して行った。

特異的 MHC分子を精製するためにアレル特異的分子を使用した。HLA-A<sub>2</sub>及びHLA-A<sub>3</sub> mAbの場合、それぞれ BB7.2及び GAPA3を使用した。精製したHLA-A<sub>3</sub>分子のSDS-PAGE分析の例を図2に示す。

図2は細胞系、EHMよりアフィニティー精製したHLA-A<sub>3</sub>の2のSDS-PAGE (12.5%)

分析を示す。アフィニティークラム (10ml) は、HLA-A3に対して特異的なモノクローナル抗体 GAPA3にカップルさせたプロテイン-A-Sepharoseビーズにより準備した。5×10<sup>8</sup>細胞の洗浄剤リゼートをこのカラムに通し、そしてこのカラムをよく洗った。結合したHLA-A3.2分子を0.15Mの酢酸50mlでこのカラムから溶離させた。1 mlの溶離物を取り出し、そして凍結乾燥してこのサンプルを濃縮させた。このサンプルをLaemmliサンプルバッファーで50μlにし、そして20μlをレーン2に載せた。レーン1は分子量標準品を含む：ミオシン 230kD；β-ガラクトシダーゼ116kD；ホスホリラーゼB 97.4kD；牛血清アルブミン66.2kD；オプアルブミン45kD；カルボニクアンヒドラーゼ31kD；ダイズトリプシンインヒビター21.5kD；及びリゾチーム14.4kD。牛血清アルブミンの標準の濃度10μgをレーン8に、3μgを9に、そして1μgを10に、タンパク質の収率の評価に役立たせるために流した。この特定のHLA-A3.2調製品に関して、推定収量は約112μgであった。

HLA-A11,A24.1及びA1に関しては、抗-HLA-B及びCモノクローナル抗体を HLA-B及びC分子を枯渇するために用いる別の方法を利用した。残りの HLA-A分子を次にW6/32 mAbを用いて下記の通りに精製した。

免疫蛍光染色分析の結果により示唆されるクラス I 発現の密度を基礎に、EBV B細胞系より単離したクラス I 抗原の平均収量は10<sup>4</sup>細胞当量当り 800~1200μgに範囲するであろうと期待された。

## 実施例 2

### クラス I の別の精製プロトコール

HLA-A2.1分子を、HLA-A抗原によってではなく、HLA-B及びCアレル分子により現わされるエピトープを検出する mAb B1.23.2を用いて単離した。mAb w6/32は、HLA-A,B及びCを含む全てのヒトクラス I 分子を検出する。上記の通り、これらの mAbは HLA-A抗原の起源を担うB細胞系とよく反応する。B1.23.2 mAbは様々なヒトB細胞系と反応するが、トランスフェクトされたHLA-A2.1タンパク質又はキメラA2.1マウスK<sup>b</sup> 分子を発現するマウス細胞系とは反応しない。それは、HLA-A及びB分子の発現性を欠くが、しかし低レベルの HLA-C分子を発現するヒ



ト細胞系CIR (Alexander, J.ら Immunogenetics, 29, 380 (1989)) と反応する。この反応性パターンは、HLA-B及びC分子のB細胞リゼートを枯渇させるのにどのようにしてB1.23.2 mAbを使用できるかを示す。

アフィニティーカラムを上記の通りにアフィニティー精製したB1.23.2及びW6/32 mAbを用いて準備した。このアフィニティーカラムの準備のための手順は上記したアレル特異的 mAbカラムの準備に関して述べた手順と本質的に同一である。上述のプロトコルを利用し、HLA-B及びC分子の清浄リゼートを枯渇するためにB1.23.2 mAb アフィニティーカラムを使用した。次に HLA-B及びCの枯渇した細胞リゼートをW6/32 mAbアフィニティーカラムに通した。この第二の通過より溶離した MHC分子はAアレル産物である。

この別のアフィニティー精製は任意の HLA-Aアレル産物の精製にとって有用であり、そしてアレル特異的 mAbについての必要性を頼りとししない。更に、これはトランスフェクトされた細胞系から任意のクラス I 分子タイプを単離するためにも使用できうる。

### 実施例 3

#### 天然プロセスを受けたペプチドの単離及び配列決定

塩基 (50mMのジエチルアミン) 溶離プロトコルに由来するHLA-A調製品のため、この溶離物を1 Nの酢酸で直ちにpH 7.0~7.5に中和した。この中和溶離物をAmicon攪拌セル [Model 8050, YM3 膜 (Amicon) 付き] 中で1~2 mlの容量に濃縮した。10mlの酢酸アンモニウム (0.01M, pH 8.0) をこの濃縮器に加えて非揮発性塩を去除し、そしてこのサンプルを約1 mlに濃縮した。少量のサンプル (1/50) を上記したタンパク質量のために取出した。残りを15mlのポリプロピレン製コニカル遠沈管 (Falcon, 2097) (Becton Dickinson) に回収した。氷酢酸を加えて10%の酢酸の最終濃度を得た。酸性にしたサンプルを沸騰湯浴の中に5分間入れて結合ペプチドを解離させた。このサンプルを氷の上で冷やし、濃縮器に戻し、そしてその濾液を集めた。更なる10%の水酢酸のアリコート (1~2 ml) を濃縮器に加え、そしてその濾液をオリジナルの濾液と一緒にプールした。最後に、1~2 mlの蒸留水を濃縮器に加え、そしてその濾液を同様にプールし

た。

その抑留物は HLA-A重鎖及び $\beta$ 2-ミクログロブリンのバルクを含み、一方、その濾液は天然プロセスを受けた結合ペプチドと、約3000未満の分子量を有するその他の成分とを含む。ブールした濾液材料を凍結乾燥してペプチド画分を濃縮した。これでこのサンプルは更なる分析のための用意が整った。

ペプチド画分のHPLC（高性能液体クロマトグラフィー）分離のため、凍結乾燥したサンプルを50 $\mu$ lの蒸留水に溶かすか、又は水中の0.1%のトリフルオロ酢酸（TFA）（Applied Biosystems）に溶かし、そしてStoneとWilliams（Stone, K. L. and Williams K.R.のMacromolecular Sequencing and Synthesis: Selected Methods

and Applications, A.R. Liss, New York, 1988, 頁7-24）に記載の勾配系を利用して、C18逆相細穴カラム（Beckman C18 Ultrasphere, 10 $\times$ 250mm）に注入した。バッファーAは水中の0.06%のTFA（Burdick-Jackson）とし、そしてバッファーBは80%のアセトニトリル中の0.052%のTFA（Burdick-Jackson）とした。流速は0.250ml/分とし、下記の勾配を伴わせた：0~60min., 2~37.5%のB；60~95min., 37.5~75%のB；95~105min., 75~98%のB。Gilson細穴HPLC配置がこの目的にとって特に有用であるが、その他の配置も同等に機能する。

数多くのピークが214nmでの吸収により検出され、その多くは潤沢性が低いようであった（図3）。一定のピークが単一ペプチドを表わすか、又はペプチドの混合物を表わしているかは決定されなかった。ブールした画分を下記の通りに配列決定にかけて各アレルに特異的なモチーフを決定した。

上記の通りに調製したブールペプチド画分をApplied Biosystems Model 1477A自動シーケンサーを用いて自動エドマン配列決定によって分析した。この配列決定法は構成アミノ酸の配列を決定するためのタンパク質及びペプチドの順次分解に関する1950年代にPehr Edmanにより開発された技術を基礎とする。

配列決定すべきタンパク質又はペプチドを加熱アルゴンバージ反応槽の中で直径12mmの孔質ガラスファイバーフィルターディスクにより保持した。このフィルターは一般にBio Brene Plus（商標）で予備処理し、次いで1又は数回のエド

マン反応の反復に循環させて夾雑物を減らし、且つその後のサンプルの配列決定の効率を高める。フィルターの予備処理に続き、サンプルタンパク質又はペプチドの溶液 ( $10\text{pmol} \sim 5\text{nmol}$ の範囲) をガラスフィルターの上に載せ、そして乾燥させる。即ち、サンプルは予備処理したディスクのフィル

ムの中に包埋させたままとする。フィルターに対するサンプルの共有結合は通常必要とされず、なぜならエドマン化学品は比較的非極性な溶媒を使用し、その中ではタンパク質及びペプチドは可溶性でないからである。

簡単に述べると、エドマン分解反応は3工程を有している：カップリング、切断及び転換。カップリング工程においては、フェニルイソチオシアネート (PITC) を加える。PITCは塩基性の環境の中で、タンパク質の自由アミノ末端アミノ酸と定量的に反応してフェニルチオカルバミルタンパク質を形成する。カップリング工程にとっての一定の時間の後、過剰の化学品を抽出し、そしてタンパク質のアミノ末端からPITC-カップル化アミノ酸残基を切断してアミノ酸のアニリノチアゾリノン (ATZ) 誘導体を生み出すために高揮発性有機酸、トリフルオロ酢酸及び TFAを使用する。残りのタンパク質/ペプチドには新たなアミノ末端が残っており、そして次のエドマンサイクルの用意が整っている。この ATZアミノ酸を抽出し、次いで転換フラスコに移し、ここでは水中の25%の TFAの添加に基づき、ATZ アミノ酸は、分析のためにマイクロボアC-18逆相HPLCカラムを使用する Mode 120 PTHアナライザーへの自動注入に従って同定及び定量することのできるより安定なフェニルチオヒダントイン (PTH) アミノ酸へと転換する。

本手順においては、ペプチド混合物をガラスフィルターの上に載せる。従って、単独のアミノ酸配列は通常得られない。むしろ、異なる取量のアミノ酸の混合物が見い出せる。特定の残基が、配列決定すべきペプチド間で保存されているなら、そのアミノ酸についての高い取量が認められる。

#### 実施例4

##### A3.2特異的モチーフの特定

A3アレルの国際命名法においていくつかのあいまいな点がある。ここでいう

A3.2アレルは細胞系EHM, H0301及びGM3107より発現される。この特定のサブタイプは現状3.2アレル (Yangの Immunobiology of HLA, 第1巻, Dupont編, Springer-Verlag, New York, 頁 43-44及び 54-55, 1989) と呼ばれるか又はA\* 0301遺伝子の産物 (その配列はStrachanら, EMBO J., 3:887 (1984) により公開されたものに相当する) と呼ばれ、そして EHM細胞系の中で見い出されたA 3 遺伝子の直接クロニング及び配列決定により確認されている。本明細書で言及しているA\* 0301遺伝子によりエンコードされるHLA-A3.2は共通に発現されるHLA-A3アレル形態である。

MAT細胞を利用する一のケースにおいて、上記の実施例3に記載の通りにして調製したプール画分をHLA-A3.2ホモ接合細胞系、例えばGM3107より得た。このプールした画分は7%~19%の  $\text{CH}_3\text{CN}$  に相当するHPLC画分である。このクラスI分に関して、クロマトグラフィーのこの領域が最もペプチドに富んでいた。個々の実験由来のデーターを下記の通りに平均した。

4つの個別の実験からのアミノ酸配列分析結果を分析し、そしてその結果を表5に示す。第一位を除く各位置に関して、このデーターは様々なHLAタイプ由来の実験の対比のため、Faikらにより述べられている方法を改良することにより分析した。この改良した手順は定量的、且つ標準化値をもたらしながら、同一のHLAタイプを包括する様々な実験に由来するデーターの平均を可能にする。

生の連続データーを簡単な10列 (それぞれ1エドマン分解サイクルを表わす) 及び16行 (それぞれ20のアミノ酸の1つを表わす; W, C, R 及びHは技術的な理由により排除した) の行列に変換した。

第1列 (第1サイクル) に相当するデーターは考慮せず、なぜならこのサイクルは通常遊離のアミノ酸がかなり夾雑しているからである。各列の値を総計してその特定のサイクルについての総 pmole値を得た。次に各列に関して、各アミノ酸についての値を対応の総収量値で除して、総シグナルのどの画分が各サイクルでの各アミノ酸に帰しているかを決定した。これを行うことにより、「絶対頻度」 ( "Absolute Frequency" ) 表を作成した。この絶対頻度表は各サイクルの傾斜収量 (declining yields) についての補正を可能にする。

絶対頻度表から出発して、次に様々なアミノ酸間の対比を可能にするために「相対頻度」表を作成した。これを行うため、各行由来のデーターを総計し、次いで平均した。次に、各値を平均行値で除し、相対頻度値を得た。標準化様式においてサイクル当り上昇及び下降するこれらの値は異なる<sup>16</sup>のアミノ酸のタイプそれぞれについて定量的に表わす。種々の実験由来のデーターから作成した表は従って平均的な相対頻度値（及びその標準偏差）を作成するために合計してよい。全ての標準偏差を次に平均して、各表由来のサンプルに適用できる標準偏差値を評価することができる。1.00を2標準偏差より大で大きい任意の特定の値を有意な上昇に相当すると考える。

HLA-A3.2についての上記の分析結果は下記の通りであった：2位において、バリン（V）の2.2倍の上昇と、構造的に類似な残基ロイシン（L）及びメチオニン（M）についての低めの上昇（1.5～1.7）。3位において、チロシン（Y）及びアスパラギン酸（D）は頻度の上昇を示した。7位において、イソロイシン（I）は上昇し、そして8位において、アスパラギン（N）及びグルタミン（Q）が上昇した。9及び10位において、リジン（K）が予測のランダム収量より2倍を越えて上昇した。

システインは修飾されず、従って検出されない。PTH-トリプト

ファンはジフェニルウレアと一緒に溶離し、そしてある実験においては、PTH-アルギニンはPTH-スレオニンの主要誘導体と一緒に溶離した。従って、システイン及びトリプトファンは検出できず、そしてアルギニンはスレオニンの非存在下でのみ検出される。

既に述べられている MHC構造は2位（又は3位）及びC末端（9位又は10位のいずれか）の臨界的保存領域の事実を示している。これらの残基は「保存」残基と呼ばれている。本発明の改良データー分析はN及びC末端での保存位置を考慮した。

即ち、HLA-A3.2モチーフはV、L又はMにより占拠された2位、9又は10のアミノ酸の長さ、及びKにより占拠されたC末端位を有すべきである。

## 表 5

## まとめ

HLA-A3.2アレル特異的モチーフ

位 置	保存残基
1	—
2	V, L, M
3	Y, D
4	—
5	—
6	—
7	I
8	Q, N
9	K
10	K

実施例 5HLA-A1-特異的ペプチドモチーフの特定

HLA-A1分子を単離し、そしてその天然プロセスを受けたペプチドを上記の実施例3に記載の通りに特定した。MAT細胞を利用する一のケースにおいては、19%~50%の  $\text{CH}_3\text{CN}$ に相当するプール画分を使用した。先の実施例のように、第一位を除く任意の一定の位置において、ランダムに予測した収量より少なくとも2標準偏差の上昇を示す残基を同定し、そして表6に示す。これらのデーターを基礎に、セリン(S)及びスレオニン(T)のみ2位において上昇した。3位においては、アスパラギン酸(D)及びグルタミン酸(E)が上昇し、そして9及び10位においてはチロシン(Y)がめざましい上昇を示した。認められたその他の上昇は4位でのプロリン(P)及び7位でのロイシン(L)である。従って、これらのデーターに基づくHLA-A1についてのモチーフは、S又はTにより占拠される2位の残基、9又は10アミノ酸のペプチドの長さ、及びYのC末端残基を有するであろう。他方、別のモチーフは3位のD又はEを、YのC末端残基と共に含んで成るであろう。

## 表 6

## まとめ

HLA-A1アレル特異的モチーフ

位 置	保存残基
1	—
2	S, T
3	D, E
4	P
5	—
6	—
7	L
8	—
9	Y

実施例 6HLA-A11アレル特異的ペプチドモチーフの特定

HLA-A11モチーフを、プールしたHPLC画分（あるケースにおいては、細胞系 BV Rより精製した HLA-A11分子より溶離された7%~45%の  $\text{CH}_3\text{CN}$ の分画ペプチド）のアミノ酸配列分析により特定した。表7に示すデータに基づき、A11についてのモチーフは、2位のスレオニン（T）又はバリン（V）の保存残基、9又は10アミノ酸のペプチドの長さ、及びリジン（K）のC-末端保存残基より成る。3位において、メチオニン（M）及びフェニルアラニン（F）の上昇も認められ、そして8位においてグルタミン（Q）が上昇していた。

## 表 7

## まとめ

HLA-A11 アレル特異的モチーフ

位置	保存残基
1	-
2	T, V,
3	M, F
4	-
5	-
6	-
7	-
8	Q
9	K
10	K

実施例 7HLA-A24.1特異的ペプチドモチーフの特定

HLA-A24.1アレル特異的モチーフは、ブールした画分（一のケースにおいては、細胞系KT3より精製したHLA-A24.1分子より溶離させた7%~19%のCH<sub>3</sub>CNのHPLC分画ペプチドに相当する）のアミノ酸配列分析により特定した。表8に示すデータを基礎に、HLA-A24.1についてのモチーフは、2位においてチロシン（Y）により占拠されている保存残基、9又は10アミノ酸のペプチドの長さ、及びフェニルアラニン（F）又はロイシン（L）のC-末端保存残基より成る。上昇はいくつかのその他の位置でも認められた：3位でのイソロイシン（I）及びメチオニン（M）；4位でのアスパラギン酸（D）、グルタミン酸（E）、グリシン（G）、リジン（K）及びプロリン（P）；5位でのリジン（K）、メチオニン（M）及びア

スパラギン（N）；6位でのバリン（V）；7位でのアスパラギン（N）及びバリン（V）；並びに8位でのアラニン（A）、グルタミン酸（E）、リジン（K



）、グルタミン（Q）及びセリン（S）。

表 8

まとめ

HLA-A24.1 アレル特異的モチーフ

位置	保存残基
1	-
2	Y
3	I, M
4	D, E, G, K, P
5	L, M, N
6	V
7	N, V
8	A, E, K, Q, S
9	F, L
10	F, A

実施例 8

免疫原性ペプチドの同定

様々な MHCクラス I についての上記のモチーフを利用し、様々なウィルス性及び腫瘍関連タンパク質由来のアレルアミノ酸配列をこれらのモチーフの存在について分析した。全ての標的抗原についての配列を GenBankデータベース (Release No.71.0; 3/92) より入手した。モチーフの同定は「FINDPATTERNS」プログラム (Devereux, Haeblerli and Smithies(1984), Nucleic Acids Research 12(1); 387-395) を用いて行った。

アミノ酸配列又はヌクレオチド配列エンコード産物は GenBankデ

ータベースより入手した。ヒトパピロマウイルス (HPV)、前立腺特異的抗原 (PSA)、p 53癌遺伝子、エプスタイン バー核抗原-1 (EBNA-1) 及びc-erbB2癌遺伝子 (HER-2/neuとも呼ばれている) 及び黒色腫抗原-1 (MAGE-1) においては単核の配列がある。

B型肝炎ウイルス (HBV)、C型肝炎ウイルス (HCV) 及びヒト免疫不全ウイルス (HIV) の場合には複数の株/単離体が存在し、そして多くの配列が GenBank に入れられている。

HBVに関して、結合性モチーフを *adr*, *adw* 及び *ayw* タイプについて同定した。同一配列の複製を避けるため、*adr* モチーフの全て、並びに *adr* において存在していない *adw* 及び *ayw* のみに由来するモチーフをペプチドのリストに加えた。

HCV の場合においては、残基 1～残基 782 由来の共通配列を 9 つのウイルス単離体より誘導した。モチーフは、この 9 つの単離体間で全く又は極くわずかな (1 残基) 変動しかない領域上で同定した。5 つのウイルス単離体由来の残基 783 から 3010 の配列も分析した。全ての単離体に共通するモチーフを同定し、そしてペプチドリストに加えた。

最後に、北米 (North American) ウイルス単離体 (10～12 のウイルス) について HIV タイプ 1 に関する共通配列を Los Alamos National Laboratory データベース (1991 年 5 月リリース) より入手し、そしてほとんどのウイルス単離体間で一定であるモチーフを同定するために分析した。小さな度合いの変動 (2 形態において 1 残基) を抱えるモチーフもペプチドリストに加えた。

下記に示している各アレルについてのいくつかのモチーフをいくつかの抗原をスクリーンするために用いた。上記に開示した全てのアレルに由来するモチーフを利用しているヒトパピロウイルス (HPV) のタンパク質 E 6 を示す (表 9)。  
。HPV タイプ 18 のタンパク

質 E 7 も全てのアレルについて探索した (表 9)。黒色腫抗原 MAGE 1, 2 及び 3 を全てのアレルに由来するモチーフについて探索した (表 10)。抗原 PSA を全てのアレルに由来するモチーフについて探索した (表 11)。最後に、C型肝炎ウイルス由来のコア及びエンベロープタンパク質も探索した (表 12)。これらの表及びモチーフの詳細において、各アミノ酸についての慣用の記号文字を使用した。文字「X」は万能札文字 (任意のアミノ酸) を表わしている。

下記のモチーフを本探索においてスクリーンした：

HLA-A1(A\* 0101) について :

1	XSXXXXXXY
2	XSXXXXXXY
3	XTXXXXXXY
4	XTXXXXXXY
5	XXDXXXXXXY
6	XXDXXXXXXY
7	XXEXXXXXXY
8	XXEXXXXXXY

HLA-A3.2(A\* 0301) について :

1	XVXXXXXXXK
2	XVXXXXXXXK
3	XLXXXXXXXK
4	XLXXXXXXXK
5	XMXXXXXXXK
6	XMXXXXXXXK

HLA-A11 (A\* 1101) について :

1	XTXXXXXXXK
2	XTXXXXXXXK
3	XVXXXXXXXK
4	XVXXXXXXXK

HLA-A24.1 (A\* 2401) について :

1	XVXXXXXXF
2	XVXXXXXXF
3	XYXXXXXXL
4	XYXXXXXXL

## MHC クラス I 結合性モチーフを有するペプチド 表 9

AA	位置	配列	抗原	HLA 分子
		30IHDIILECVY	HPV16. E6	A1
		69VCDKCLKFY	HPV16. E6	A1
		77YSKISEYRHY	HPV16. E6	A1
		80ISEYRHYCY	HPV16. E6	A1
		92GTTLEQQYNK	HPV16. E6	A11
		93TTLEQQYNK	HPV16. E6	A11
		106LLIRCINCQK	HPV16. E6	A3
		2HGDTPTLHBY	HPV16. E7	A1
		16QPETTDLYCY	HPV16. E7	A1
		44QAEPDRAHY	HPV16. E7	A1
		89IVCPICSQK	HPV16. E7	A3, A11
		3RFEDPTRRPY	HPV18. E6	A1
		4FEDPTRRPY	HPV18. E6	A1
		25LQDIEITCVY	HPV18. E6	A1
		41LTBVFEFQK	HPV18. E6	A11
		72YSRIRELRY	HPV18. E6	A1
		84SVYGDITLEK	HPV18. E6	A3, A11
		101LLIRLCRCQK	HPV18. E6	A3
		59HTMLCMCK	HPV18. E7	A11

ヒト パピロマ ウィルス16及び18 (E 6 及び E 7 タンパク質)

## MHC クラス I 結合性モチーフを有するペプチド 表 10

AA	位置	配列	抗原	HLA 分子
		2SLEQRSLECK	MAGE 1	A3
		96SLFRAVITK	MAGE 1	A3
		96SLFRAVITKK	MAGE 1	A3
		108DLVGFLLLK	MAGE 1	A3
		128MLESVIKNYK	MAGE 1	A3
		128MLESVIKNY	MAGE 1	A1
		152QLVFGIDVK	MAGE 1	A3
		161EADPTGHSY	MAGE 1	A1
		182LLGDNQIMPK	MAGE 1	A3
		215WEELSVMEVY	MAGE 1	A1
		223VYDGREHSAY	MAGE 1	A1
		238LLTQDLVQEK	MAGE 1	A3
		239LTQDLVQEK	MAGE 1	A11
		239LTQDLVQEKY	MAGE 1	A1
		240TQDLVQEKY	MAGE 1	A1

黒色腫抗原MAGE 1

MHC クラス I 結合性モチーフを有するペプチド 表 11

AA 位置	配列	抗原	HLA 分子
	211VGGWECEK	PSA	A3, A11
	57LTAHICIRNK	PSA	A11
	88VSHSFPHPLY	PSA	A1
	95PLYDMSLIK	PSA	A3
	178DVCAQVHPQK	PSA	A3, A11
	182QVHPQKVTK	PSA	A3, A11
	236PSLYTKVVHY	PSA	A1
	239YTKVVHYRK	PSA	A11
	241KVVHYRKWIK	PSA	A3, A11
	242VVHYRKWIK	PSA	A3, A11

前立腺特異的抗原 (PSA)

MHC クラス I 結合性モチーフを有するペプチド 表 12

AA 位置	配列	抗原	HLA 分子
	2STNPKPQRK	HCV	A11
	14NTNRRPQDYK	HCV	A11
	43RLGVRATRK	HCV	A3
	302VQDCNCSIY	HCV	A1
	556WMNSTGFTK	HCV	A3
	605LTPRCMVDY	HCV	A1
	626PTIFKIRMY	HCV	A1

C型肝炎ウィルス (共通配列)

実施例 9定量的 HLA クラス I 結合アッセイ

モチーフ含有ペプチド配列が本当に適当なクラス I 分子に結合できるかを確認するため、特異的結合アッセイを樹立した。HLA-A3.2

分子を GM3107 EBV 細胞より、A3.2 を単離するための GAPA3mAb (抗-A3) を用い

るアフィニティークロマトグラフィーにより精製した。この工程の前に、そのリゼートは一般的に上記の実施例2に記載の通り B1.23.2カラム（この抗体はB、C特異的である）に繰り返し通すことによってHLA B及びC分子が枯渇されている。

放射性ラベルプローブとして、A 3.2モチーフを含むペプチド941.12 (KVFPYALINK) を使用した。このペプチドは上記のA 3.2特異的バインダーの結合したアンカー残基V<sub>2</sub>及びK<sub>10</sub>を含む。Y残基を5位に挿入して放射性ヨウ素化を可能にした。ペプチドを、引用することで本明細書に組入れるBuusらScience 235: 1352 (1987) のクロラミンT液の利用によりラベルした。

投与量範囲の精製A 3.2を10nMの941.12と、pH7.0及び23℃で、プロテアーゼインヒビターカクテル（1 mMのPMSF、1.3mMの1.10フェナノスロリン、73μMのペプスタチンA、8 mMのEDTA及び200μMのNap-トシル-L-リジンクロロメチルケトン (TLCK)）及び1μMの精製β<sub>2</sub>-ミクログロブリンの存在でインキュベートした。2日後、%結合放射性を、引用することで本明細書に組入れるSe HerらのSeminars in Immunology、第3巻、Geffer編 (W.B.Saunders, Philadelphia, 1991)、頁195-202のクラスIIペプチド結合アッセイについて前記した通りに、TSK 2000カラムでのゲル濾過により測定した（図4参照のこと）。35-300nMに範囲するA 3.2の濃度に関して良好な結合性（60-100%の範囲）が認められた。15nMのA 3.2では30%の結合性が認められた。

A 3.2の使用量を最少限にし、且つアッセイの感度を高めるため、5-10nMのA 3.2の濃度を更なるアッセイのために選んだ。図5に示す実験において、7 nMのA 3.2及び等濃度の放射性ラベル化941.12を上記の条件を利用し、且つ投与量範囲の3種のペプチド

(HBC 18-27(924.07)、前立腺特異的抗原ペプチド(939.01)及びHIV nef 73-82(940.03))の存在下でインキュベートした。ペプチド940.03は22nMの50%阻害濃度(IC50%)で強く阻害され、一方ペプチド939.01では弱い阻害(IC50% 940nM)が観察された。最後に、ペプチド924.07は30μMのレベルに至るまでなんら阻害は示されなかった。即ち、ペプチド940.03及び939.01はそれぞれ高及び中

親和性バインダーであり、一方ペプチド924.07は低親和性又はネガティブなバインダーに分類されるものと考えられる。

本明細書にわたり、結果は $IC_{50}$ で表わしている。アッセイを行う条件を一定にすると（即ち、MHC及びラベル化ペプチド濃度を限定すると）、これらの値は $K_D$ 値に近づく。 $IC_{50}$ 値はアッセイ条件を変えたとき、及び使用した特定の試薬に依存して（例えばクラス I 調製品等）しばしば劇的に変動しうること注目すべきである。例えば、過剰な濃度のMHCは一定のリガンドの見かけ測定された $IC_{50}$ を高めるであろう。

これらの不確定性を回避するための結合性データーを表わす別の様式の対照ペプチドに対する相対値である。対照ペプチドは全アッセイに含まれる。特定のアッセイの感度が高まる又は低くなるにつれ、ペプチドの $IC_{50}$ は若干変動しうる。しかしながら、対照ペプチドに相対する結合性は変動しないであろう。例えば、対照ペプチドの $IC_{50}$ が10倍上昇するような条件下で流すアッセイにおいては、全ての $IC_{50}$ も約10倍シフトするであろう。従って、あいまいさを避けるため、ペプチドが良好か、中程度か、弱い、又はネガティブなバインダーであるかを決定するために用いる規定値は対応の係数により修正すべきことが理解されようであろう。例えば、もしA 2.1結合アッセイにおいて、A 2.1標準品 (941.01) の $IC_{50}$ を5 nMの代わりに8 nMで測定すると、ペプチドリガンドは、通常の50nMのカッ

トオフ値の代わりに80nM（即ち、 $8nM \times 0.1$ ）未満の $IC_{50}$ を有する場合にのみ良好なバインダーと呼ばれるであろう。

ここに記載の実験系は様々な異なる種のクラス I 特異性に対する多大な数の合成ペプチドの結合性を試験するのに利用できる。特異的結合アッセイは下記のようにして実施される。

#### HLA-A11特異的アッセイ

細胞系 BVRを HLAの起源として用いた。 $\beta_2$  Mの存在下又は非存在下での MHC濃度に及ぼす結合力の依存性を図6に示し、一方図7は過剰非ラベル化リガンドによる阻害の投与量依存性を示す。— 6 nMの見かけ上の $K_D$ の値及び10%の活性レセプターが得られ、そしてA 2.1及びA 3.2について得られた値に対するその類



似性がめざましかった。放射性プローブとして用いたペプチドの配列はAVDLYHFLKである。

#### HLA-A1-特異的アッセイ

本ケースにおいては、EBV細胞スタインリン (Steinlin) を精製HLAの起源として使用した。他のHLAアレルの精製に予め適用したのと同じのプロトコール (即ち、B1.23.2 mAbカラムによるB、C分子の枯渇、それに続くW632 mAbカラムによるA分子の精製) を利用した。プール配列決定データーを基礎に、共通ペプチドを合成し、直接放射性ラベルし、そして標準のプロトコール (1mMの $\beta_2$  M; プロテアーゼインヒビターの存在下で2日間のRTインキュベーション) を利用してHLA結合性について試験した。%結合性と $\mu$ M仕込みHLA A1との関係を示すグラフを図9に示す。このデーターより、HLA A2,3及び11について観察されたものとの類似性において、~10%の結合性を得るのに30nMほどの少なさで十分であることが考えられる。放射性ラベル化プローブ (944.02) として用いたペプチドの配列はYLEPAIAKYである。次のセットの実験において、樹立した

アッセイの特異性を、過剰の未ラベル化ペプチドによるその居住性によって確認した。IC50%は~20nMと測定された (図10)。更なるスキッチャード分析 (図11) は、相互作用の見かけ上のK<sub>d</sub>が21nMに相当し、活性レセプターの%が5.1%に相当することを確認した。

#### HLA-A24特異的アッセイ

HLA-A24分子をKT3 EBV細胞系から精製した。このケースにおいて、配列がプール配列決定データーを基礎とする2つの共通ペプチドを合成した。その配列は: 979.01, AYIDNVYKF、及び979.02, AYIDNYNKFである。仕込みMHCの関数としてのこれらの2種のペプチドの%結合性を測定する実験の結果を図12に示す。両ケースにおいて、10~15%の結合性が20~50nMのMHCほどの小ささで得られた。MHC濃度を限定した低温阻害実験 (図13) は、結合が未ラベル化ペプチドにより、それぞれ30及び60nMの見かけ上のK<sub>d</sub>で容易に阻害性であることを示した。更なるスキッチャード実験は136nM及び28nMの値それぞれを確認した。有用なレセプター (活性MHC) の見かけ上の%はそれぞれ8.3%及び7.4%であった (図

9 a 及び b)。これらのデータに基づき、ペプチド979.02をA<sup>24</sup>アッセイのための標準ラベルインジケータとして任意に選んだ。更に、ここに記載のデータに基づき、A<sup>24</sup>-特異的結合性アッセイを樹立する目標が達成されたものとも我々は考えた。結果として、5種の主要HLA アレルについての特異的アッセイを述べてきた。

#### 実施例10

##### HLA-Aモチーフの展開

インビトロ結合アッセイの樹立は、課題の様々なアレル (HLA A1,A2,A3,A11及びA24) に対する様々な合成ペプチドの結合能のインビトロ定量を容易にする。このことは、様々なHLA Aモチーフを担

持するペプチドを介してのこのモチーフの、精製 HLA分子に結合するその能力についての真偽を確認せしめる。典型的には、アラニン残基のみより成る中性骨格の中にかくれた特異的な HLAモチーフでペプチドを合成する。あるケースにおいては、可溶性を高める目的で、配列の中にK残基も導入する。クラスII分子の場合に適用するかかる「中性」ポリA骨格の利用は例えば Jardetzkyら (Jardetzkyら, EMBO J.9(6): 1797,1990) に詳細されている。

例えば、A<sup>3.2</sup>の場合、モチーフは2位の疎水性残基及び9位の正帯電 (K) で特定される。即ち、これらの2つのアンカー残基の存在がポリA骨格に関してA<sup>3.2</sup>結合を可能にするかを検証するため、配列 AMAAAAAAKを有するポリA類似体を合成した (表13)。

同様に、その他の HLAモチーフを担持するその他のペプチドも合成し、そしてHLA結合性について試験した。全てのケースにおいて、特異的な HLAモチーフの存在は、125~2.8nMより成る推定K<sub>d</sub>での対応の HLAアレルに対する結合を誘発することが認められた。ほとんどのケースにおいて、この結合は、無関係なアレルに対する結合が検出されない点で、絶対的に特異的でもある。この一般的な法則に反する2つの例外のみが認められた。一つは、A<sup>3</sup>とA<sup>11</sup>ペプチドは互いかなり交差反応し、それはおそらくこれら2つのアレルについてのモチーフはかなり似ていることにより予測されうる。第二に、一部のA<sup>1</sup>ペプチドはかかる低

めの親和性にもかかわらず、A<sup>11</sup>及びA<sup>3,2</sup>と交差反応した。

ペプチドエピトープと課題の様々なクラス I アレルとの相互作用にとつての構造的な要件を更に特定するため、表13に示す9残基ペプチドの一部の長さ10残基数の類似体を合成した(表14)。これらの類似体はポリA骨格の中に追加のA<sup>1a</sup>残基を挿入して、そのアンカー残基が2位及び10位に位置しないようにする(先の表における

2及び9と異なるようにする)ことにより作った。得られる結果は、10残基数のモチーフもそのやや低めの効率性にかかわらず、対応のクラス I アレルに特異的に結合することができることを示した。

まとめると、これらのデータは、適当なモチーフを含む9量体及び10量体のペプチドは共にHLAに結合できることを確証した。これらのデータに基づき、8量体又は11量体のペプチドも、おそらくは低親和性であるかもしれないが結合可能であろう。

上記のデータは、アンカー位置における所定の残基の存在がHLA結合性を(少なくとも「中性」ポリA骨格において)可能にすることを示す。この重要なアンカー位置においてどの程度その他のアミノ酸(例えば化学的に近縁するアミノ酸)が寛容されるかを調べるため、表13のポリAペプチドの一部の類似体を合成し、ここでその2位(又は3位)又は9位にある残基を変えておいた。この分析の結果を表15~19に示す。

A<sup>3,2</sup>の場合(表15)、2位におけるL, M, I, V, S, A, T及びFが好ましいことが見い出され(先に特定したアンカー残基に対して結合力 $\geq 0.1$ )、一方、C, G及びDが許容された(先に特定したアンカー残基に対して結合力 $\geq 0.01 \sim 0.1$ )。この位置における、Dとの類似性を理由とするEの置換も寛容される。9位においては、K, R及びYが好ましい。性質における類似性を理由に、H及びFも好適であろう。その他の残基はどれもA<sup>3</sup>結合に関して9位では寛容されなかった。

A<sup>11</sup>の場合(表16)、2位における好適な残基はL, M, I, V, A, S, T, G, N(L及びQは類似性による)である。寛容されたのはC, F, D(及び

類似性によりE)であった。9位においては、Kが好ましく、そしてRが寛容された。Hも類似性により寛容されるであろう。

A 24の場合(表17)、Y及びF(そして類似性によりW)が好ましく、その他の残基は寛容されなかった。9位においては、F、I及びL(並びに延長によりW及びM)が好ましい。その他の残基は寛容されなかった。

A 1のケースにおいては、3つの異なるアンカー残基が既に特定されている。先の章に示す結果は、それらが互いに独立して作用することを示している(即ち、3つのアンカーのうちの2つが結合にとって十分であろう)。これは真実である。この理由のため、2つのアンカーを含む類似体を合成してどの残基が各位置において好ましい又は寛容されるかを特定した。表18に示すデータは、2位において、T、S及びMが好ましく、そしてその他の残基は寛容されないことを示す。3位においては(表19)、D及びEが好ましく、そしてA、S(及び類似性により)Tが寛容された。最後に、9位においては、Yのみが好ましくは、その他の残基は寛容されなかった(表19)。

従って、このデータに基づき、2つの好適な残基の任意の組合せを担持するペプチドが結合できると考えられる。「不完全」モチーフを含むペプチド、即ち、一の位置において好適な残基を、そして他方のアンカー位において寛容されているものを担持するものは、若干低めの親和性にかかわらず、結合可能であろう。様々なMHCクラスIアレルについての本発明のモチーフを利用して、様々なウイルス及び腫瘍関連タンパク質由来のアミノ酸配列をモチーフの存在について分析した。このモチーフ分析の結果を表23a～kに示す。

#### 実施例11

#### HPV16ペプチドのかたよりのないセットによるHLAペプチド結合性モチーフのバリデーション

ヒトパピロマウイルス(HPVs)は、頸部癌の病因(Pfister,H.

(1974) *Biology and biochemistry of papillomaviruses*, Rev. Physiol.Biochem. 99:111; zur Hausen,H. (1991)。Human papillomaviruses in the pathogen

esis of anogenital cancer. *Virology*.184:9) にかかわり、そして世界中の癌に基づく全死亡数の10%までを占める (zur Hausen,H. (1991) 。 *Viruses in Human Cancers*.*Science*,254:1167) 。頸部癌は世界中の女性の癌に関連する死の2番目の最も一般的な原因である (Parkin,D.M., Laara, E.及びMuir,C.S. (1988) ) , Estimates of the worldwide frequency of sixteen major cancers (1980) ) . *Int.J.Cancer*.41:184) 。

HPV DNAは90%より大の頸部癌腫及びほとんどのHPV 16ゲノタイプに存在している (Resnick,R.M.,Cornelissen,M.T.,Wright D.K.,Eichinger,G.H.,Fox,H.S.,ter Schegget,J.,and Manos,M.M. (1990) 。 Detection and typing of human papillomavirus in archival cervical cancer specimens by DNA amplification with consensus primers. *J.Natl.Cancer Inst*; Van den Brule,A.J.C.,Walboomers,J.M.M.,du Maine,M., Kenemans,P.,and Meijer,C.J.L.M. (1991) 。 Difference in prevalence of human papillomavirus genotypes in cytologically normal smears is associated with a history of cervical intraepithelial neoplasia. *Int.J.Cancer*. 48:404) 。 HPV 16初期領域6及び7 (E6, E7) オープンリーディングフレームの、げっ歯動物細胞 (Yasumoto,S.,Burkhardt, A.L.,Doniger,J.,and Dipaolo,J.A. (1986) 。 Human Papillomaviruses type 16 DNA induced malignant transformation of NIH3T3 cells.*J.Virol*.57:572) 及びヒトケラチノサイト (Pirisi.L.,Yasumoto,S.,Feller,M.,Doniger,J.,and Dipaolo,J.A. (1987) 。 Trans-formation of human fibroblasts

and keratinocytes with human papillomavirus type 16 DNA.*J. Virol*,61:1061) をインビトロで不死する能力並びにヒト線維芽細胞 (Smits,H.L.,Raadsheer,E.,Rood,I.,Mehendale,S., Slater,R.M.,van der Noordaa,J., and ter Schegget,J. (1988) 。 Induction of anchorage-independent growth of human embryonic fibroblasts with a deletion in the short arm of chromosome 11.*J.Virol* .62:4538) を形質転換する能力は、頸部発癌の多段階過程におけるHPV 16の直接的なかわり合いを示唆する。

一般に、T細胞免疫性、特に細胞障害性Tリンパ球 (CTL) により媒介される

ものがウイルス誘発型腫瘍に対する防御において重要である (Melief, C.J. (1992)。Tumor eradication by adoptive transfer of cytotoxic T lymphocytes。Adv.Cancer Res.58:143; Melief, C.J., and Kast, W.M. (1992)。Lessons from T cell responses to virus induced tumors for cancer eradication in general. Cancer Surv.13:81)。近年、マウスのモデルにおいて、HPV 16 E7発現性腫瘍に対する多少の度合いの防御が、HPV16 E7発現細胞による免疫を経た CTL より得られることが報告されている

(Chen, L., Thomas, E.K., Hu, S.L., Hellström, I., and Hellström, K.E. (1991)。Human papillomavirus type 16 nucleoprotein E7 is a tumor rejection antigen。Proc.Natl. Acad.Sci.88:110; Chen, L., Ashe, S., Brady, W.A.,

Hellström, I., Hellström, K.E., Ledbetter, J.A., McGowan, P., and Linsley, P.S. (1992)。Costimulation of Antitumor immunity by the B7 counterreceptor for the T lymphocyte molecules CD28 and CTLA-4. Cell.71:1093)。CTLによるインビボ防御が近年マウスモデルにおいて示され、それにおいては CTLエピトープ含有合成ペプチドがウイルス感染に対するマウスの効果的

な感作のために使用されている (Schulz, M., Zinkernagel, R.M., and Hengartner, H. (1991)。Peptide-induced antiviral protection by cytotoxic T cells。Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:991; Kast, W.M., Roux, L., Curren, J., Blom, H.J.J., Voordouw, A.C., Meleon, R.H., Kolakowski, D., and Melief, C.J.M. (1991)。Protection against lethal Sendai virus infection by in vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with an unbound peptide. Proc.Natl.Acad.Sci. USA.88:2283)。更に、マウスのモデルにおいて、HPV 16誘発型腫瘍に対する完全な防御はウイルス癌遺伝子 E7 に由来する CTLエピトープによるペプチド種痘により達せられることが現在示されている。

HPV 16 E6及びE7遺伝子生成物がHPV 16誘発型腫瘍に対する種痘のために最も

所望されている標的抗原である。両方ともHPV 16形質転換癌細胞の中で保持され、且つインビボで高く発現され (Baker, C.J., Phelps, W.C., Lindgren, V., Braun, M.J., Gonda, M.A., and Howley, P.M. [1987]。Structural and transcriptional analysis of human papillomavirus type 16 sequences in cervical carcinoma cell lines。J.Virol.61:962; Smotkin, D., and Wettstein, F.O. [1986]。Transcription of human papillomavirus type 16 early genes in a cervical cancer and cancer-derived cell line and identification of the E7 protein。Proc.Natl.Acad.Sci.USA.83:4680)、そしてインビトロでの細胞形質転換の誘発及び維持にかかわっている (Crook, T., Morgenstern, J.P., Crawford, L., and Banks, L. [1989]。)

Continued expression of HPV-16 E7 protein is required for maintenance of the transformed phenotype of cells

co-transformed by HPV-16 plus EJ ras。EMBO J.8:513; Hawley- Nelson, P., Vossen, K.H., Hubbert, N.L., Lowy, D.R., and Schiller, J.T. [1989]。HPV 16 E6 and E7 proteins cooperate to immortalize human foreskin keratinocytes。EMBO J.8:3905)。

E6及びE7の発現への頸部癌に由来する細胞系のインビトロ増殖の依存性は頸部癌腫細胞系の表現型の維持におけるこれらの癌遺伝子のかかわり合いを強調する (Von Knebel Doeberitz, M., Bauknecht, T., Bartch, D., and zur Hausen, H. [1991]。)

Influence of chromosomal integration on glucocorticoid-regulated transcription of growth-stimulation papillomavirus genes E6 and E7 in cervical carcinoma cells。Proc.Natl. Acad.Sci.USA.88:1411)。ヒトについての CTL エピトープ及び HPV 16の有能なワクチン候補を決定するため、我々はHPV 16 E6及びE7タンパク質配列に広がるペプチドを、最も頻度の高いヒト MHC分子、即ち、HLA-A1, A3.2, A11.2及び A24に対する結合能力についてスクリーンした。組合せたこれら5つのアレルは世界の人口の約90%を占めるであろう (Dupont, B., ed. [1987]。Immunology of HLA Vol. I—Histocompatibility Testing. Spring

er-Verlag, New York)。

全HPV 16 E6及びE7癌遺伝子配列を重複してカバーする長さ9 aa及び8 aaの240通りの重複合成ペプチドの完全なセットを合成した。これらのペプチドを上記した結合アッセイにおける上記のHLA分子との結合能力について試験した。この分析の結果は、対応HLAアレルに対する全てのペプチドの相対親和力を示し、そして表20(a) - (d)におけるヒトに対するペプチドベースワクチンにおいて使用するための可能な候補となるCTLエピトープを示した。

この結果は、上記したHLAアレルに対する本発明に記載のペプチ

ド結合性モチーフが、タンパク質のどのペプチドが特定のHLA分子の溝の中に結合する傾向にあるかを推定せしめる。我々は大型、且つかたよりのないペプチドのセットを使用したため、このペプチド結合性分析の結果を、これらのモチーフの、その予測の能力、並びにペプチドにおいて2位(3)及び9位上に特定のアンカーaa残基を有する必要性の両方についての値を評価するために用いた。

ペプチド。ペプチドは固相手法により、多重ペプチド合成装置 (Abimed AMS422) で、Fmoc保護化アミノ酸のポリスチレンの樹脂への添加をFmoc-脱保護手順で交互に行う繰り返しサイクルによって作った (Gausepohl, H., Kraft, M., Boulin, Ch., and Frank, R.W. [1990]。Automated multiple peptide synthesis with BOP activation. Proc. of the 11th American peptide symposium. J.E. Rivier and G.R. Marshall, Ed. ESCOM, Leiden. 1003-1004)。

C末端においてCOOH基を抱える全てのペプチドを樹脂から切り、そして側鎖保護基を水性TFAによる処理によって除去した。ペプチドを逆相HPLCにより分析し、凍結乾燥し、そして使用前に3%のDMSO (Sigma, St. Louis, MD 63175) を含むリン酸緩衝食塩水の中で1 mg/mlの濃度に溶解した。溶解したら、これらのペプチドを-70℃で保存した。システイン含有ペプチドは合成及び操作中に(空気)酸化を受け易いので、これらのペプチドはシステインの代わりにアラニンで合成した。

種々のHLA-Aアレルに結合するHPV 16 E6及びE7タンパク質に由来するペプチドの同定。全HPV 16 E6及びE7タンパク質の配列をカバーする長さ9 aaであり、



そして8 aaで重複する240通りのペプチドの完全なセットを5種の HLA-A分子に  
対する結合性について試験した。

この分析の結果を表20 (a) - (d) に示す。表20 (a) には

HLA-A1分子に結合するHPV 16のペプチドが記載されている。全てのペプチドを試  
験した。リストしているのは $\geq 0.001$ の比の値をもたらすペプチドのみである。

2つのペプチドがこの分子に対して高親和性で結合し ( $>0.1$ )、6が中程度の  
親和性 ( $0.1 \sim 0.01$ )、そして1が低親和性 ( $0.01 \sim 0.001$ ) で結合することがわ  
かった。ペプチドを、様々な実験で得られたデーターとの対比を可能にするため  
、比の値でランク分けした。50%の阻害投与量 ( $IC_{50}$ ) をもたらすのに必要なペ  
プチドの濃度を計算するため、標準  $IC_{50}$  の値をこの比で除しなければならない。  
例えば、ペプチド E6-80は23nMの  $IC_{50}$  を有する ( $81/3.5$ )。

表20 (b) にはHLA-A3.2分子に結合するペプチドが記載されている。7つのペ  
プチドが高親和性バインダーとして、6が中親和性バインダーとして、そして13  
が低親和性バインダーとして同定された。表20 (c) には HLA-A11.2分子に結合  
するペプチドが記載されている。6の高親和性ペプチド、4の中親和性ペプチド  
、そして10の低親和性ペプチドが同定された。この高親和性結合ペプチド (E6-5  
9IVYRDGNPY 及びE6-80 ISEYRHYAY) 並びに9位にYを有するこの弱親和性結合性  
ペプチド (E6-42 QQLRREVV, E6-69 VADKALKFY) がHLA-A11.2に関して同定された  
。最初の2つのペプチドの高結合力及び9位においてYが好適である。HLA-A11.  
2モチーフとHLA-A3.2モチーフとの類似性を考え、チロシンが HLA-A11.2モチ  
ーフの9位に含まれているべきである。表21 (b) と (c) とを対比し、A 3.2及  
びA 11.2分子の両者に結合するペプチドの大きな重複があることが明らかである  
。これらの2つの HLA分子に結合する28のE 6及びE 7ペプチドのうちの18が重  
複しており、そして8のペプチドのみがHLA-A3.2にとって、そしてこのペプチド  
が HLA-A11.2にとって固有であった。

最後に、表20 (d) には HLA-A24分子に結合するペプチドが記載されている。  
ここで、2のペプチドが高親和性結合性ペプチドとして、5が中親和性結合性ペ

プチドとして、そして5が低親和性結合性ペプチドとして同定された。1の高親和性ペプチド (E6-72KALKFYSKI) 及び1の中親和性ペプチド (E7-49 RAHYNIVTF) が同定され、2位のAが HLA-A24モチーフに許容されているべきことを示唆している。これらの関係は全て表20-eに示している。これらの表を分析するうえで、2~7の高親和性結合性ペプチドが試験したHLA-A分子の全てに関して同定されることが考えられる。時折り、いくつかのペプチドはより多くのアレルに結合する。3のペプチド (E 6-7, E 6-37及びE 6-79) がHLA-A2.1,A3.2及びA11.2に結合した。1のペプチド (E 6-38) が HLA-A3.2,A11.2及びA24に、そして2のペプチド (E 6-69及びE 6-80) がHLA-A1,A3.2及び A11.2に結合した。しかし、これらの交差反応性ペプチドは1又は複数の異なる HLA分子と弱くしか結合しなかった。しかしながら、一般に、HLA-A3.2及び HLA-A11.2分子を除き、ほぼ全てのHLA 分子が固有のペプチドと結合できることが考えられる。

HPV 16 E6及びE7ペプチドのかたよりのないセットによるHLA-Aペプチド結合性モチーフのバリデーション。

我々は、本明細書に記載のアンカー位置についてのモチーフがペプチドの結合性をどのようによく予測せしめるか、及びその逆、即ちどのようによく結合性ペプチドが同定モチーフに従うかを分析した。このため、ペプチドを強バインダー、中バインダー、弱バインダー及びネガティブバインダーとしてランク分けし、そして多ペプチドに関して、表6のアンカーモチーフの法則を基礎とするモチーフ推定を分析した。2 (3) 及び9アンカーモチーフの全体的な効率性を計算し、そして表20 (e) にまとめた。種々の HLA-A分子に

ついて前述したモチーフはかなり正確であるものと考えられる。100%のHLA-A 1,A3.2及び A24の強バインダー並びに67%のHLA-A11.2のそれが推定されるであろう。中バインダーについてさえも分析した HLA-A分子に依存して40~100%が予測されるであろう。更に、予測される弱結合性ペプチドのパーセントは低く、そして結合すると予測されたが実際には結合しなかったペプチドのパーセンテージはこれらアレル全てに関して非常に低かった。

別々に分析したHLA-A1に結合すると予測された12のペプチドは高又は中親和性で結合した。このことは、これらの潜在的な CTL エピトープを見い出すのに数種のペプチドを作るだけでよいことを示唆する。HLA-A3.2, A11.2及び A24についての数字はそれぞれ10/32, 7/26及び4/7であった。このことは、これらのアレル全てについての推定値が良好であることを意味する。先に記載のモチーフにより推定されていない一部のペプチド(表21(a)～(d)における(一))の他に、2, (3)及び9アンカーモチーフにより推定されたいくつかのペプチドは結合せず、適正なアンカー残基を有することが常に結合のために十分であるのではなく、そして非アンカー残基がペプチドの結合性に負の寄与を及ぼしていることを意味している。

### 実施例12

モチーフの存在は必要であるが、高親和性クラス I 結合にとって十分でない

種々のモチーフの存在がどのように、対応の HLA アレルに対する種々のペプチドの結合能力に影響を及ぼするかを調べるため、様々な潜在的な標的分子の配列をモチーフ含有ペプチドについてスキャンした。このようにして同定したペプチドを合成し、そして結合について試験した。A 3.2の場合、205のペプチドのうちの39 (19

%)のみが1～50nMの範囲における高親和力で結合することが見い出せた(表20)。そのうちの22.4%が中親和力(50～100nMの範囲)で結合し、一方、34.6%が弱く結合した(500nM～50μMの範囲)。最後に、その23.9%が少なくとも50μMのレベルで全く結合しなかった。A 11の場合、100ペプチドのうちの33 (33%)が1～50nMの範囲の高親和力で結合した。そのうちの35%が中親和力(50nMの範囲)で、一方24%が弱く(500nM～50μMの範囲)で結合した。最後に、その8%が少なくとも50μMのレベルで全く結合しなかった。

類似の結果がA 1及びA 24の場合においても得られた(データは示さず)。

同タイプの分析をA 3.2及びA 11モチーフのいずれかを担持する10量体ペプチドのケースにおいても行った(表22(a)及び(b))。これらのケースにおいて、良好なバインダーの頻度でさえも低かった(それぞれ17.5%及び29.8%)。

これらのデーターは、10量体ペプチドを含むモチーフが、一般に低い親和力にもかかわらず実際に結合できうることを確認せしめる。

まとめると、この章に示すデーターは、適正なアンカー残基の存在は良好な H<sub>2</sub>LA結合を可能にするのに本質的でないことを明確に示す。それ故、2（3）及び9（又は10）以外の位置に含まれている残基の種類が結合に影響を及ぼしうることが明らかである。この所見の最も好適な解釈は、所定の残基の（2及び9以外の位置での）存在はペプチド決定基の結合能力を無効に又は高めることができることにある。

先の章に示したデーターは、モチーフ含有ペプチド内の免疫原性であるペプチドを同定するのにどのようにして結合性アッセイを使用できるかを述べている。我々はまた、別の手法、即ち、モチーフ含有ペプチド内のどのペプチドが良好又は中間的なバインダーであ

り、そしてそれ故免疫原性でありうるかを推定できるであろう手順を誘導する手法を企立てることを要望する。他の実験においては中間的又は良好なバインダーと示されていないものが免疫原性であると示された。特に、結合にネガティブな影響を及ぼす残基を同定するため、A<sub>3,2</sub>A<sub>11</sub>並びに9量体及び10量体を含む全てのモチーフ含有ペプチドについての全ての分析を行った。A<sub>11</sub>の場合、非結合性ペプチドの少なさのため、その分析が一方では良好と中間的なバインダーとを、そして他方では弱と結合しないバインダーとを対比するために異なるカットオフ値を利用した。

### 実施例13

#### 免疫原性ペプチドを同定する計算法

上記の実施例13に示す結果を鑑みて、アンカー又は保存残基に加えて、ペプチド配列の各位置においての様々な残基の効果に基づく結合性のより正確な推定因子を提供する計算法を開発した。より詳しくは、我々は、ペプチド伝いの各位置においての各アミノ酸についての点数を規定する。各特定のアレルについての計算法を開発するために、A<sub>1</sub>, <sub>3</sub>, <sub>11</sub>又は24モチーフ含有ペプチドの我々のコレクションのスクリーニング中に得られたデーターバンクを利用した。各残基につい

ての点数は、良好及び中間的なバインダーにおけるその残基の頻度、対、非バインダーにおけるその残基の存在頻度の比とした。

本計算法において、残基は類似性によりグループ分けした。このことは、統計学的に有意な比を得るには存在数が少なすぎる稀な残基、例えばトリプトファンにより遭遇する問題を回避する。リスト表は、モチーフを規定する保存残基を含む9量体ペプチド(2/9モチーフ)についての位置によって20のアミノ酸それぞれについてグループ分けすることによって得られる点数より成る。ペプチドは各

残基の点数の積としてこの計算式において点数付けした。

結合力を補正する計算式の力は、良好なバインダーの最も高い存在率を有するペプチドの集団を推定する能力により更に裏付けされる。特定の MHCアレルに結合する9量体ペプチドを推定するために例えば単に2/9モチーフのみを頼りにすると、大量の数のモチーフ含有ペプチドが良好なバインダーと推定されうであろう。実際にはこれらのペプチドのうちのわずかしが中間的なバインダーでなく、同時にこのモチーフにより推定されるペプチドの大多数は弱結合性又は結合できないペプチドのいずれかである。他方、本発明のグループ分け計算法を用いると、より高いパーセンテージの良好なバインダー、更により高いパーセンテージの中間的なバインダーを有するペプチドの集団が作り上げられ、そしてモチーフ含有ペプチドにより推定されるのより小さいパーセンテージのものは弱及び非バインダーである。

本計算式の例はペプチドの各位置の特定の残基の影響を測定するための、バインダー及び非バインダーにおけるアミノ酸の存在頻度の比を利用する。類似の計算式を作り出すのに別の方法があることを当業者は直ちに理解するであろう。例えば、計算表を作成するために、平均結合親和値又はポリアラニン骨格を有するモチーフ含有ペプチドにおける単個アミノ酸置換の相対結合を利用しう。

平均結合親和力を利用する計算式は、分析において全てのペプチドを含み、そして良好/中間的バインダー及び非バインダーだけでないという利点を有する。更に、これは単純なグループ比計算法より親和力のより定量的な測定値を供する。我々はいかかる計算法を、各アミノ酸について、位置により、我々のモチーフ含

有ペプチドのセットの中に特定の残基が存在しているときの結合力の平均対数を計算することによって作った。ペプチドについての計算点数は、各

残基についての位置による点数の合計とする。

#### 実施例14

##### 有効な HLAアレル特異的抗原表示細胞の調製

本例は有効な HLAアレル特異的抗原表示細胞 (APC) を調製するための低温インキュベーション又は酸ストリップ/ペプチド負荷方法の利用を実例する。APCは、抗原特異的細胞障害細胞の開発へと導かれる前駆細胞障害性Tリンパ球を感作するために用いた。これはフィトヘムアルグチニン (PHA) T細胞プラスト又は末梢血液単核細胞 (PBMC) 又はスタフィロコッカス アウレウス (Staphylococcus aureus) Cowan I (SAC-I) 活性PBMCを APCとして用いることによって行った。これらの結果は他の APC及び他の MHCアレルに適用できる。

以下には下記の実施例において使用した材料の起源を記載する：

L-アスコルビン酸、Cat# B582, J.T.Baker, Phillipsburg, NJ。

抗-HLA A2 (BB7.2) , Cat# HB82, ATCC, Rockville, MD。

抗-HLA DR (LB3.1) , J.Gorga, Children's Hospital, Pittsburgh, PA由来。

抗-HLA アルファ-鎖パン ABC (9.12.1) , R.DeMars, University of Wisconsin, Madison, WI由来。

抗-マウス IgG FITCコンジュゲート、Cat# F2883, Sigma, St. Louis, MO。

$\beta_2$ ミクログロブリン、Cat# M0114, Scripps Labs, San Diego, CA。

BSA 画分V, Cat# A9418, Sigma, St. Louis, MO。

50ccコニカル遠沈管、Cat# 2070, Falcon, Lincoln, Park, NJ。

Cryo1℃凍結用容器、Cat# 5100-0001, Nalge, Rochester, NY。

凍結バイアル、Cat# 5000-0012, Nalge, Rochester, NY。

ジメチルスルホキシド (DMSO) 、Cat# D2650, Sigma, St. Louis, MO。

DNAse, Cat # 260912, Calbiochem, San Diego, CA 。

Dynabeads M-450ヤギ抗-マウス IgG, Cat# 110.06, Dynal, Great Neck, NY。

EDTA四ナトリウム塩、Cat# ED4SS, Sigma, St. Louis, MO。

FACScan, Becton Dickinson, San Jose, CA。

胎児牛血清 (FCS)、Cat# 3000, Irvine Scientific, Irvine, CA。

フィコルーバク、Cat# 17-0840-03, Pharmacia, Piscataway, NJ。

ジェンタマイシン、Cat# 600-5750AD, Gibco, Grand Island, NY。

L-グルタミン、Cat# 9317, Irvine Scientific, Irvine, CA。

GS-6KR 遮心器、Beckman Instruments, Palo Alto, CA。

ヒト A B 血清 (HS)、Cat# 100-112, Gemini Bioproducts, Calabasas, CA。

ヒト rIL-2, Sandoz, Basel, Switzerland。

ヒト rIL-7, Cat# F1-1587-1, Genzyme, Cambridge, MA。

イソプロパノール、Cat# A464-4, Fisher Scientific, Pittsburgh, PA。

MicroCELLector T-150 培養フラスコ (CD4+細胞選別用)、Cat# 8030, Applied Immune Sciences, Menlo Park, CA。

Micromedic 自動ガンマーカウンター、ICN Micromedics Systems, Huntsville, AL。

OKT4 ハイブリードーマ上清液、Cat# CRL 8002, ATCC, Rockville, MD。

パラホルムアルデヒド、Cat# T-353, Fisher, Pittsburgh, PA。

PBS カルシウム及びマグネシウムフリー (OMF)、Cat# 17-516B, BioWhittaker, Walkersville, MD。

本研究において使用したペプチドは Cytel で合成し、そして表 24a

に示す。

フィトヘムアグルチニン (PHA)、Cat# HA-16, Wellcome, Dartford, England。

RPMI 1640 + ヘベス + グルタミン、Cat# 12-115B, BioWhittaker, Walkersville, MD。

RPMI 1640 + ヘベス + グルタミン、Cat# 380-2400AJ, Gibco, Grand Island, NY。

塩化ナトリウム (NaCl)、Cat# 3624-05, J.T. Baker, Phillipsburg, NJ。

クロム酸 ( $^{51}\text{Cr}$ ) ナトリウム、Cat# NEZ 030, NEN, Wilmington, DE。

リン酸ナトリウムモノベース、Cat# S9638, Sigma, St. Louis, MO。

Triton X-100, Cat.# X-100, Sigma, St. Louis, MO.

24穴組織培養プレート、Cat.# 3047, Falcon, Becton Dickinson, San Jose, CA.

96穴U-底クラスタープレート、Cat.# 3799, Costar, Cambridge, MA.

培養培地。PHAプラスト及びCTL誘発は、2 nMのL-グルタミン (Irvine Scientific) 及び 50  $\mu$ g/mlのゲンタマイシン (Gibco) 及び5%の熱不活性化ブールヒトAB型血清 (Gemini Bioproducts) [RPMI/5%HS]の添加されたRPMI 1640 + ヘベス + グルタミン (Gibco) の中で行った。EBV形質転換リンパ腺維芽細胞系 (LCL) を、上記のL-グルタミン及びゲンタマイシン並びに10%の熱不活性化胎児牛血清 (Irvine Scientific) [RPMI/10%のFCS]の添加されたRPMI 1640 + ヘベス + グルタミン [Biowhittaker] の中に維持した。クロム放出アッセイをRPMI/10%のFCSの中で行った。

サイトカイン。組換えヒトインターロイキン-2 (rIL-2) (Sandoz)

を10U/mlの最終濃度で使用した。組換えヒトインターロイキン-7 (rIL-7) (G enzyme) を10ng/mlの最終濃度で使用した。

末梢血液単核細胞 (PBMC) の単離。全血をヘパリン (10U/ml) 含有シリンジの中に集め、そして50ccのコニカル遠心管 (Falcon) の中で1600rpm (Beckman GS-6KR) 15min遠心した。その血漿層を除き、そして10mlのパッフィーコートで10mlのピペットで円運動により集めた。そのパッフィーコートを徹底的に混合し、そして等容量の無血清 RPMI 1640で希釈した。希釈したパッフィーコートを次に50ccのコニカルチューブの中の20mlのフィコルーパック (Pharmacia) の上に載せ、そして400gで室温でブレーキをオフにして遠心した。PBMCを含むそのフィコルー血漿界面を分注ピペットを用いて集め (50ccのチューブ当り2界面)、そして50mlのRPMIで10分3回 (1700, 1500及び1300rpm) 洗った。

PBMCの凍結融解。PBMCを凍結バイアル (Nalge) を用い、1mlのアリコートにおいて、 $30 \times 10^6$  細胞/1mlの90%のFCS + 10%のDMSO (Sigma) において凍結した。凍結バイアルをイソプロパノール (Fisher) を含むCryo 1℃凍結用容器 (Nalge) の中に入れ、そして-70℃に4hr (最短) ~一夜 (最長) 置いた。イソプロパノールは5回の使用毎に交換した。凍結バイアルを長期保存のために液体窒



素に移し入れた。PBMCは37℃の湯浴の中で最後の結晶がほぼ融解するまで連続振盪しながら融解させた。細胞を直ちにDNAse 30  $\mu$ g/mlを含む無血清RPMI培地(凝集を防ぐため)(Calbiochem)に希釈し、そして2回洗った。

リンパ球サブ集団の枯渇。CD4リンパ球枯渇は抗体コート化フラスコを用いて行った：CD4+細胞の選別のためのMicro CELlectorT-150フラスコ (Applied Immune Sciences) をその製造者の仕様書に従って、25mlの PBS CMF+1 mMの EDTA (Sigma) により、そのフラ

スコを30秒間攪拌し、それに続いて平らな面の上で室温で1 hrインキュベートすることによって洗った。バッファーをアスピレート吸引し、そしてフラスコを2回更に 30sec攪拌し、且つ結合面の被覆を保持することで洗った。洗った各フラスコに、25mlの培養培地+5%のHSを加え、そして平らな面の上で室温で 20minインキュベートした。培地が細胞を受け入れる準備が整うまでフラスコの中に放置した。PBMCを30  $\mu$ g/mlの DNAseを含むRPMI/5%のHSの中で融融し、そして2回洗った。洗浄液中のHSは PBMC上のFcレセプターをブロックする。1本のフラスコ当たり最大で $12 \times 10^7$ の細胞を25mlの培養培地の中に再懸濁させた。培養培地をフラスコからアスピレートし、次いでその細胞懸濁物を Micro CELlectorに慎重に入れた。細胞を含むフラスコを平らな面の上で室温で1hrインキュベートした。インキュベーションの終了時に、そのフラスコを横にゆっくりと10秒間ゆらして非接着細胞を再懸濁した。非接着CD4枯渇細胞を集約させ、次いでフラスコをPBS CMFで2回洗って非接着細胞を集めた。集めたCD4-枯渇細胞を遠心によりペレット化し、そして完全培養培地 (RPMI/5%/HS) の中に再懸濁した。

PHAプラストの作成。PBMCを標準のフィコルーパクプロトコルを用いて単離した。凍結細胞を使用前に2回洗った。細胞を1  $\mu$ g/mlの PHA (Wellcome) 及び10U/mlの rIL-2を含むRPMI/5%HS中で $2 \times 10^6$ /mlで培養した。PHAプラストを10U/mlの rIL-2を含む培養培地の中で必要なだけ供給及び分割しながら維持した。PHAプラストは培養6日目に APCとして用いた。エンブティーとなったクラス I 分子の作成及びペプチド負荷は、これらの APCを用いたときに酸ストリップ洗によってのみ実施した。

PBMC及びPHAブラストの酸ストリップ／ペプチド負荷。PBMCをフィコルーバクプロトコールを利用して単離した。凍結細胞を利用す

るとき、PBMCは使用前に2回洗った。細胞を用意したら、それらを低温滅菌 0.9 % NaCl (J.T.Baker) + 1 % の BSAの中で一回洗った。50 c c のコニカル遠沈管の中で、これらの細胞を低温滅菌クエン酸－リン酸バッファー [ 0 ~ 13M の L－アスコルビン酸 (J.T.Baker) 、 0.06M の リン酸ナトリウムモノベース (Sigma) 、 pH 3 , 1 % の BSA 3  $\mu$  g / ml の  $\beta_2$  ミクログロブリン (Scripps Labs) ] の中に  $10^7$  / ml で再懸濁し、そして氷上で2分インキュベートした。直ちに、5容量の低温滅菌中和バッファー # 1 [ 0.15M の リン酸ナトリウムモノベース pH 7.5 , 1 % の BSA , 3  $\mu$  g / ml の  $\beta_2$  ミクログロブリン、10  $\mu$  g / ml のペプチド ] を加え、そして細胞を 1500rpm で5分、4℃でペレットにした。細胞を1容量の低温滅菌中和バッファー # 2 [ PBS CMF , 1 % の BSA , 301ig / ml の DNAase , 3  $\mu$  g / ml の  $\beta_2$  ミクログロブリン、40  $\mu$  g / ml のペプチド ] の中に再懸濁し、そして20℃で4 h r インキュベートした。細胞を培養培地で約  $5 \times 10^6$  / ml に希釈し、そして6000 rads で照射した。次に細胞を1500rpm で5 min 室温で遠心し、そして培養培地に再懸濁した。この酸ストリップ／ペプチド負荷細胞を CTL 誘発培養 (以下) に直ちに使用した。

酸ストリップ／ペプチド負荷した自己PBMC又はPHAブラストを刺激因子として使用する一次 CTL の誘発。PBMC及び PHAブラストの酸ストリップ／ペプチド負荷は上記の通りである。刺激細胞とペプチドとの最後の4時間のインキュベーションの際、応答性細胞集団を調製した：応答体はCD4+細胞の枯渇したPBMCである (上記)。応答細胞を培養培地の中に  $3 \times 10^6$  / ml で再懸濁した。1 ml の応答細胞懸濁物を24穴組織培養プレート (Falcon, Becton Dickinson) の各ウェルに分注した。このプレートを37℃、5 % の CO<sub>2</sub> のインキュベーターの中に、刺激集団の用意が整うまで入れておいた。照射を付したら、刺激 APC を、PBMC については  $10^6$  / ml、PHAブラストに

ついては  $3 \times 10^6$  / ml において20ng / ml の rIL-7 を含む培養培地の中に再懸濁した

。ウェル当り1 mlの刺激細胞懸濁物を応答付含有プレートに加えた。誘発して7日後、200ng/mlの rIL-7を含む100  $\mu$  lの培養培地を各ウェルに加えた（最終的には20ng/ウェルのrIL-7）。誘発して10日後、200U/mlの rIL-2を含む100  $\mu$  lの培養培地を各ウェルに加えた（最終的には20U/ウェルの rIL-2）。

CTLの抗原再刺激。誘発の12~14日目において、この一次 CTLを接着 APCを用いてペプチドで再刺激した。自己PBMCを融解し、そして上記の通りに洗った。細胞を6000radsで照射に付した。細胞をベレットにし、そして培養培地に4  $\times 10^6$  /mlで再懸濁した。24穴組織培養プレートの各ウェルに1 mlの細胞懸濁物を加え、そして37℃、5%の CO<sub>2</sub>で2 hrインキュベートした。非接着細胞を各ウェルを無血清RPMIで3回洗うことにより除去した。この工程の後、3  $\mu$  g/mlの $\beta_2$  ミクログロブリン及び20  $\mu$  g/mlの全ペプチドを含む0.5mlの培養培地を各ウェルに加えた。APCを2 hr、37℃で、5%のCO<sub>2</sub>下で、このペプチド及び $\beta_2$  ミクログロブリンをインキュベートした。ウェルをアスピレートに付し、そして培養培地中の1.5  $\times 10^6$  /mlの応答細胞1 mlを各ウェルに加えた。2日後、20U/mlのrIL-2を含む培養培地1 mlを各ウェルに加えた。

細胞傷害性クロム放出アッセイ。一次誘発の再刺激の7日後、この培養物の細胞傷害活性を評価した。

a. エフェクター細胞の調製：この工程では「エフェクター」と呼ぶ応答細胞を遠心し、そしてRPMI/10%のFCSの中で10<sup>7</sup> /mlで再懸濁させた。エフェクターの3倍系列希釈を行って100:1, 33:1, 11:1及び3:1のエフェクター、対、標的の比を得た。エフェクター細胞をデュプリケートで、96穴U底クラスタープレート (Costar) で 100  $\mu$  l/ウェルに小分けした。

b. 標的細胞の調製：アッセイの約16~20hr前に、標的細胞を、3  $\mu$  g/mlの $\beta_2$  ミクログロブリン及び10  $\mu$  g/mlの総ペプチドの存在下又は非存在下でRPMI/10%のFCSの中で3  $\times 10^5$  /mlにおいて再懸濁した。プレインキュベーション後、標的細胞を遠心し、そしてベレットを 200  $\mu$  l (300  $\mu$  Ci) のクロム酸 (<sup>51</sup>Cr) ナトリウム (NEN) の中に再懸濁した。細胞を撚拌しながら37℃で1 hrインキュベートした。ラベル化標的細胞をRPMI/10%のFCSで3回洗った。

c. アッセイの準備: 標的細胞濃度をRPMI/10%のFCSの中で $10^5$ /mlに調整し、そして $100\mu$ lのアリコートを応答体を含む各ウエルに加えた。K 562細胞 (NK及びLAK活性をブロックする寒冷 (cold) 標的) を洗い、そしてRPMI/10%のFCSの中に $10^5$ /mlで再懸濁した。 $20\mu$ lのアリコートを各ウエル当りに加え、20:1の寒冷K 562標的: ラベル化標的を得た。自発性 $^{51}\text{Cr}$ 放出の決定のため、 $100\mu$ l/ウエルのRPMI/10%のFCSを $100\mu$ l/ウエルのラベル化標的細胞及び $20\mu$ l/ウエルのK 562に加えた。最大 $^{51}\text{Cr}$ 放出のため、PBS CMF中の $100\mu$ lの1%のTriton-X100 (Sigma) を $100\mu$ l/ウエルのラベル化標的細胞及び $20\mu$ l/ウエルのK 562に加えた。プレートを1200rpmで2分遠心して細胞融合形成を加速させた。アッセイを5 hr 37℃、5%の $\text{CO}_2$ でインキュベートした。アッセイをそのプレートを1200rpmで5 min遠心し、そして $100\mu$ l/ウエルの上清液を集めることにより回収した。標準のガンマー計測技術を%比分解を決定するために使用した (Micromedic自動ガンマーカウンター、0.5min/チューブ)。

培養細胞系。HLA A2.1発現性ヒト EBV-形質転換B細胞系であるJYをRPMI/10%のFCSの中で増殖させた。NK細胞感受性赤芽球系であるK 562をRPMI/10%のFCSの中で増殖させた。K 562はクロム放出アッセイにおいてNK及びLAK細胞によるバックグラウンド殺傷を

下げるために用いた。

ペプチド。これらの研究において用いるペプチドはCytelで合成し、そしてその配列を表24aに記載する。ペプチドを100%のDMSOの中で20mg/mlで希釈し、小分けし、そして-20℃で保存した。

FACS分析。約 $10^6$ の細胞を試験すべき各抗体に関して使用した。細胞をPBS CMF + 0.1%のBSAで2回洗った。各サンプルに、 $100\mu$ lのPBS CMF + 0.1%のBSA

+ 一次抗体 $2\mu$ g/ml (BB7.2, ATCC) 又は (9.12.1, Inserm-CNRS, Marseille, France) 又は (LB3.1, Children's Hospital Pittsburgh) を加えた。ネガティブなコントロールを常に加えておいた。細胞を氷の上で20分インキュベートし、そしてPBS CMF + 0.1%のBSAで2回洗った。細胞を $100\mu$ lの抗-マウスIgG FITCコ

ンジュゲート (Sigma) の中に再懸濁し、PBSQMF+0.1%のBSAの中に1:50で希釈し、そして氷の上で20minインキュベートした。細胞をPBSQMF+0.1%のBSAで2回洗い、そしてFACSscan (Becton Dickinson) 分析のためにPBSの中に再懸濁した。分析を後日に延期する必要があるとき、細胞をPBS/1%のパラホルムアルデヒド (Fisher) で固定し、そして1週間以内に分析した。

完全細胞及び放射性ラベル化ペプチドを用いる結合性アッセイ。JY細胞をクエン酸-リン酸バッファー及び中和バッファー#1で上記の通りに処理した。JYコントロール細胞は組織培養培地の中で未処理のままとしておいた。処理後、両細胞集団を無血清RPMIで2回洗い、そして $^{125}\text{I}$ -放射性ラベル化941.01 (HBC 15-27) ペプチド (標準クロラミンTヨウ素化) を負荷した。結合特異性を決定するため、 $2 \times 10^6$  の細胞を  $^{125}\text{I}$ -941.01 ( $10^5$  cpm)  $\pm 100 \mu\text{g}$  の未ラベル941.01を含む $200 \mu\text{l}$ の中和バッファー#2 (上記) の中に再懸濁した。細胞を $20^\circ\text{C}$ で4hrインキュベートし、そして無血清

RPMIで2回洗って遊離ペプチドを除去した。細胞を $200 \mu\text{l}$ の無血清RPMIに再懸濁した。マイクロ遠沈管の中で、細胞懸濁物を $800 \mu\text{l}$ のFCSの上に載せ、そして5秒の遠心によりペレットにした。上清液をアスピレート除去し、そしてペレットの中に残っている放射活性を測定した (Micromedic自動ガンマカウンター、1min/チューブ)。

### 実施例15

#### 温和な酸処理によるクラスI MHC分子ペプチドストリップ/負荷。

グリシン又はクエン酸-リン酸バッファーの如きの温和なpH3の酸性溶液が、内生ペプチドを同定及び腫瘍肉連T細胞エピトープを同定するために様々なグループにより利用されている。この処理は、MHCクラスI分のみが不安定化され (そしてペプチドが放出され)、MHCクラスII分子を含むその他全ての表層抗原は完全のままとなっている点で固有である。最も重要には、本実施例の温和な酸溶液による細胞の処理が細胞の生存性及び代謝状態に影響しないことにある。この温和な処理は迅速であり、なぜなら内生ペプチドのストリップは $4^\circ\text{C}$ で2分において起こり、そしてAPCは適当なペプチドを負荷した後にその機能を発揮する用

意が整っているからである。本例においては、我々は一次抗原-特異的 CTLの発生のためにペプチドを APCに対して特異的にする技術を利用する。得られる APCはペプチド特異的CD8+CTLを誘発するのに有効である。

FACS分析による測定。PHA-誘発化T-細胞プラストを実施例15記載の方法に従って酸ストリップ/ペプチドを負荷した。得られる細胞を抗-HLA-A2 (BB7.2) 及び抗-HLA アルファ鎖-特異的 (9.12.1) モノクローナル抗体を用いてFACS分析のために染めた。この実験のためのコントロールは、pH3では処理していない (しかしpH7.2の PBSバッファーで処理した) 細胞集団と、クエン酸-リ

ン酸バッファーでは処理したが (MHCを除去するため)、 $\beta_2$  ミクログロブリン及びペプチドの非存在下で中和した細胞とを含む。図15に示す結果は、これらの細胞のクエン酸-リン酸 (pH3) バッファーによる処理が、両方の抗-HLA クラス I 抗体単独 (抗-HLA-A2及びアルファ鎖特異性) に対する細胞の反応性を有意に下げることが (10分の1)、クラス II MHC分子 (抗-HLA-DR) に特異的なモノクローナル抗体に対しての反応性は下げないことを示唆する。最も重要には、 $\beta_2$  ミクログロブリン及びペプチドの存在下での酸ストリップ細胞の中和は蛍光強度において 2.5分の1の低下のみを保って、有意な量のクラス I MHC抗体-反応性部位の保存をもたらすことになる。重要には、この酸処理細胞は、トリパンブルー排除及び前進/後退FACSスキャッター分析により測定される通り、生存し続ける。同様の結果が EBV形質転換B細胞系、新鮮 (又は凍結) PBMC、及びその他のペプチド (HLA-A2.1又はHLA-A1) のいずれかと結合するものを用いて得られた (データは示さず)。

エンブティーな MHC分子に対する放射性ラベル化ペプチドの結合。低温インキュベーション又は酸ストリップ/ペプチド負荷プロトコールを利用するペプチド負荷の効率を決定するため、JY細胞 (HLA-A2.1 EBV-形質転換B細胞系) を26℃で一晩ブレインキュベートするか、又は酸ストリップに付して内性 MHC結合化ペプチドを除去し、そして外生ペプチドの負荷を  $^{125}$ I-放射性ラベル化HLA-A2.1結合性ペプチドを用いて決定した。この反応の特異性を、同じ配列の寒冷ペプチドを用いてラベル化ペプチドの結合の阻害を測定することにより決定した。表24

b)に示す結果は、細胞の酸処理が、JY細胞に対するラベル化ペプチドの結合量を有意に(約10倍)高めることを示した。更に、ラベル化ペプチドの結合は寒冷ペプチドの添加により完全にブロックされ、特異的な結合を示した(データは示さず)。

酸ストリップ/ペプチド負荷APCSを用いる一次抗原特異的 CTLのインビトロ誘発。低温インキュベーション及び酸ストリッププロトコールの両者を利用する一次 CTLの誘発のための追加の臨界的なパラメーターは：1) 応答細胞集団中のCD8+ T-細胞の富化(又はCD4+ T-細胞の枯渇)、2) 0日目由来の CTL誘発培養に対するrIL-7の添加、及び3) ペプチドをパルスした自己接着細胞を用いての12~14日目での抗原によるこの培養物の再刺激；である。図16及び17に示す結果は、PBMC及び PHA-誘発化T細胞プラストの APCとして用いて行った実験を示している。図18は APCとして PHA誘発化T-細胞プラストを用いる実験を示し、一方、図19は APCとしてのPBMCの利用を示す。

#### 実施例16

##### CTLエピトープを同定するためのペプチドのスクリーニング

CTLエピトープを同定するために、CTLを APCとしての SAC-I活性化PBMCにより刺激した。クラス I  $\beta$ -2 ミクログロブリン複合体が不安定である MHCの低温発現を酸ストリップに加えて利用してPBMC APCを作った。

完全培養培地。本研究において用いた組織培養培地は、RPMI1640とヘベス及び L-グルタミン (Gibco) とより成り、2 mMの L-グルタミン (Irvine Scientific)、0.5 mMのピルビン酸ナトリウム (Gibco)、100 U/100  $\mu$ g/mlのペニシリン/ストレプトマイシン (Irvine) 及び5%の熱不活性化AB型ヒト血清 (RPMI/5%のHS; Gemini Bioproducts) が添加されている。EBV-形質転換系の増殖に用いる培養培地はヒト血清の代わりに10%の熱不活性化胎児牛血清 (RPMI/10%のFCS, Irvine) を含む。

サイトカイン。組換えヒトインターロイキン-2 (rIL-2) 及びインターロイキン-4 (rIL-4) をSandozより入手し、そしてそれぞれ10

U/ml及び10ng/mlの最終濃度で使用した。ヒトインターロイキン-2 (IFN-2) 及び組換えヒトインターロイキン-7 (rIL-7) をGenzymeより入手し、そしてそれぞれ20U/ml及び10ng/mlで使用した。

ペプチド。ペプチドは Cyte1で合成し、そして表24aに記載してある。ペプチドを 100%のDMSOの中に20mg/mlに通常に希釈し、小分けし、そして使用するまで-70℃で保存した。

細胞系。JY、スタインリン、EHM、BVR及びKT3はそれぞれHLA2.1,A1,A3,A11及びA24を発現するホモ接合ヒト EBV-形質転換B細胞系である。これらはRPMI/10%の FCSの中で増殖する。RPMI/10%の FCSの中で増殖させたNK細胞感受性の赤芽球系 K 562を CTLアッセイにおけるバックグラウンド殺傷を低下するために使用した。MAGE抗原を発現するme1397及び me1 938、又はMAGE抗原を発現しないme 1888のいずれかの黒色腫細胞系もRPMI/10%のFCSの中で増殖させた。

末梢血液単核細胞の単離 (PBMCs)。全血をヘパリン含有シリンジの中に集め、そして50ccのチューブの中で1600RPM (Beckman GS-6KD) で15分遠心した。次いで血漿層を除去し、そして10mlのバッフィーコートを手動で円運動を利用して集めた。このバッフィーコートをよく混合し、そして等容量のRPMIで希釈した。次にこのバッフィーコート (30ml) を20mlのフィコルーバク (Pharmacia) の上に載せ、そしてブレーキをオフにして1850RPM (400g) で20分、25℃で遠心した。フィコルーバクもPBMC含有血漿との界面を分注ピペットで回収し (50mlのチューブ当たり2界面)、そして50mlのRPMIで3回洗った (1700,1500及び1300RPMで10分)。細胞を10~20mlの培養培地に再懸濁し、計測し、そして適当な濃度に調整した。

PBMCの凍結。3千万の細胞/チューブ (90%のFCS/10%のDMSO; Sigma) を、イソプロパノール (Fisher) を含むNalgene Cryo 1℃

凍結用容器に挿入し、そして-70℃で4hr (最短) ~一夜 (最) 放置した。イソプロパノールは5回毎に交換した。チューブを液体窒素に長期保存のために移し入れた。融解のため、PBMCを37℃の湯浴の中で最後の結晶がほぼ融解するまで連続振盪した (チューブはそれ以上は湯浴又は室温で放置しなかった)。細胞を30



$\mu\text{g}/\text{ml}$ のDNaseを含む無血清RPMIに希釈して死んだ細胞DNAによる凝塊を防ぎ、次いで2回洗った。

APCとしてのSAC-I活性化PBMCを用いる一次CTLの誘発

a. APCの調製: PBMCを標準のフィコルーバクプロトコールを用いて精製し、そして0.005%のパンソービン (Pansorbin) 細胞 (プロテインAを発現するSAC-I細胞; Calbiochem)、 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ のImmunobeads (ウサギ抗-ヒトIgM; Bio-rad) 及び $20\text{ng}/\text{ml}$ のヒトrIL-4を含むRPMI/5%のFCSの中に $1\times 10^6/\text{ml}$ で再懸濁した。ウェル当たり2mlの細胞を24穴プレート (Falcon, Becton Dickinson) の中でプレートし、そして $37^\circ\text{C}$ で培養した。3日後、培地を除去し、そして細胞を3回洗い、次いでRPMI/10%のHSを加えた。細胞はRPMI/10%のHSの中で更に2日間培養した後に用いた。

b. APCの表層上でのエンブティーなクラスI分子の発現及びAPCのペプチド負荷。

1. 低温インキュベーション:

a. APCにおけるエンブティーなMHCの発現: APCを、 $10\text{ng}/\text{ml}$ のrIL-4、 $20\text{U}/\text{ml}$ のヒトIFN-2及び $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\beta_2$ -ミクログロブリン ( $\beta_2\text{m}$ ; Scripps Lab) を含む完全培養培地の中で $2\times 10^6/\text{ml}$ の濃度に調整した。これらの細胞を次に5%の $\text{CO}_2$ の存在下で $26^\circ\text{C}$ で一夜インキュベートした。これらの細胞はエンブティーな状態でわずかなクラスI分子しか発現しないことに注目すべきである ( $\approx 10\%$ )。

b. APC刺激細胞のペプチド負荷:

エンブティーなクラスIを発現するAPCを無血清RPMI (+L-グルタミン及びヘベス) で1~2回洗い、そして全部で $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドプール (即ち、3プールにおいては $16.7\mu\text{g}/\text{ml}$ づつのペプチド; 2プールにおいては $25\mu\text{g}/\text{ml}$ づつのペプチド; 単一プールにおいては $50\mu\text{g}/\text{ml}$ づつのペプチド)、 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ のDNase及び $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\beta_2\text{m}$ を含む無血清RPMIの中に $1\times 10^7$ に再懸濁した。 $20^\circ\text{C}$ で4時間のインキュベーション後、これらの細胞を $6100\text{rads}$ で照射し ( $5\times 10^6/\text{ml}$ ; 2千5百万細胞/チューブ)、洗い、そして誘発培養物への添加

のために適当な濃度に調整した（下記参照）。

2. 酸ストリップ：これは APCの表層上にエンブティーな MHCを作り上げるための別の方法として利用した。SAC-I活性化PBMCを1%のBSAを含む低温の0.9%の塩化ナトリウム（J.T.Baker）の中で1回洗った。その細胞を1%のBSA及び $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\beta_2\text{m}$ を含む低温クエン酸-リン酸バッファー（0.13MのL-アスコルビン酸（J.T.Baker）、0.06Mのリン酸ナトリウムモノベース（Sigma）、pH3）の中で $10^7/\text{ml}$ に再懸濁し、そして氷上でインキュベートした。2分後、5容量の1%のBSA、 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\beta_2\text{m}$ 及び $10\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドを含む低温の0.15Mのリン酸ナトリウムモノベースpH7.5（中和バッファー#1）を加え、そして細胞を1500RPMで5分4℃で遠心した。その細胞を、1%のBSA、 $30\mu\text{g}/\text{ml}$ のDNase、 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ の $\beta_2$ ミクログロブリン及び $50\mu\text{g}/\text{ml}$ のペプチドを含む1mlの低温PBS（中和バッファー#2）に再懸濁し、そして20℃で4時間インキュベートした。上記の通り、20℃で4時間のインキュベーション後、その細胞を6100radsで照射し（ $5 \times 10^6/\text{ml}$ ；2千5百万細胞/チューブ）、洗い、次いで誘発培養物への添加のため

に適当な濃度に調整した（下記参照）。

c. CD4+枯渴PBMC応答細胞集団の調製（AISフラスコを利用するリンパ球サブ集団の枯渴） AIS Micro Collector T-150フラスコ（CD4+T細胞の枯渴のために特製；Menlo Park, CA）を25mlのPBS/1mMのEDTAを加えることにより下準備し、全ての表面が湿るように30秒攪拌し、次いで結合面を下にして室温で1時間インキュベートした。このインキュベーション後、フラスコを30秒強く攪拌し、PBS/EDTAで1回、PBSで更に2回洗い、次いで25mlの培養培地と15分インキュベートした。PBMCを $30\mu\text{g}/\text{ml}$ のDNaseを含む無血清RPMI（+L-グルタミン+ヘパス）の中に融解し、1回洗い、そして培養培地の中で15分インキュベートした。フラスコからの培養培地のアスピレーション後、1億8千万個までのPBMCを $30\mu\text{g}/\text{ml}$ のDNaseを含む25mlの培養培地に加えた。室温で1時間後、そのフラスコを10秒ゆっくりとゆらして非接着細胞を再懸濁させた。CD8+T細胞を含む非接着細胞懸濁物を集め、そしてそのフラスコをPBSで2回洗った。このCD4+T細胞

枯渴PBMCを遠心し、そして誘発培養物への添加のために計測した。CD4+枯渴細胞集団のCD4+及びCD8+表現型をFACS分析により決定した(以下参照)。一般に、この技術はCD8+T細胞の2倍富化をもたらし、CD4+T細胞枯渴を経て約40~50%のCD8+T細胞及び15~20%の残留CD4+T細胞となる。CD4+T細胞の枯渴は抗体及び補体又は抗体コート化磁性ビーズ(Dynabeads)によっても成し遂げられる。CD4+T細胞の枯渴はCTLpを富化する、及び細胞栄養素に関して競合し、且つCTLp増殖を阻害しうる細胞を除去する目的を担う。

d. 一次CTLの誘発。刺激 APCの4時間にわたるペプチド負荷の際、応答集団として使用すべきCD4+枯渴PBMCをCD4+T細胞の枯渴にわたる(上記)CD8+T細胞の選別のためにAISフラスコを利

用して調製した。この応答細胞を1mlの容量において $3 \times 10^6$  /mlでプレートし(24穴プレート)、そしてペプチド負荷刺激 APCが調製されるまで37℃に入れておいた。照射したペプチド負荷 APCを無血清RPMI(+L-グルタミン及びヘベス)で1回洗い、完全培地の中で $1 \times 10^6$  /mlに調整し、そして24穴プレートに1ml/プレートでプレート培養した。PBMCに関しては、 $1 \times 10^6$  の刺激細胞(1ml容量)を応答細胞含有ウェルの中でプレート培養した。SAC-I活性化PBMC及びPHAブラストに関しては、1mlの $3 \times 10^6$  /mlの刺激細胞を各ウェルの中でプレート培養した。 $10 \mu\text{g/ml}$ の最終濃度の追加ペプチドを $10\text{ng/ml}$ の最終濃度の rIL-7(2mlの総容量)の他に加えた。7日目にて、更に $10 \mu\text{g/ml}$ の rIL-7をこの培養物に加え、そしてその後3日毎に $10\text{U/ml}$ の rIL-2を加えた。12日目において、この培養物をペプチドパルスした接着細胞で再刺激し、そして7日後に細胞溶解活性について試験した(以下)。

接着 APCを用いる一次 CTLの再刺激のためのプロトコール。PBMCを $30 \mu\text{g/ml}$ の DNaseを含む無血清RPMI(+L-グルタミン及びヘベス)の中で融解し、2回洗い、そして DNaseを含む培養培地の中で $5 \times 10^6$  /mlに調整した。PBMC(2千5百万細胞/5mlのチューブ)を6100Rで照射した。1回の洗浄後、PBMCを培養培地に再懸濁し、そして $4 \times 10^6$  /mlに調整した。1mlの照射PBMCを24穴プレートのウェル当りに加えた。このPBMCを37℃で2時間インキュベートし、非接着

細胞を除去するために3回洗い、そして0.5mlの容量において $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ の全ペプチド及び $3 \mu\text{g}/\text{ml}$ の $\beta_2$  ミクログロブリンを含む培地の中で培養し、そして37℃で2時間インキュベートした。このペプチドをアスピレートし、そして培養培地の中に再懸濁した $1.5 \times 10^6$  の応答細胞を1mlの容量で加えた。2日後、 $20 \text{U}/\text{ml}$ のrIL-2を含む1mlの培養培地を加えた。

FACS分析。百万の細胞/チューブを遠心し、 $100 \mu\text{l}$ /チューブにおいてPBS/0.1%のBSA/0.02%のアジ化ナトリウム (Sigma) と $10 \mu\text{l}$ /チューブの直接コンジュゲート化抗体 (Becton Dickinson) の中に再懸濁し、そして氷の上で15~20分インキュベートした。次いで細胞をPBS/0.1%のBSA/0.02%のアジ化ナトリウムで2回洗い、そしてPBSの中に再懸濁してFACScan (Becton Dickinson) で分析した。サンプルを1~2日以内に分析できないとき、細胞を1%のパラホルムアルデヒド (Fisher) を含むPBSで固定し、そして1週間以内に分析した。

#### 細胞障害アッセイ

a. 標的細胞の調製。CTLアッセイの約16~20時間前に、標的細胞 (クラスI 対合 EBV-形質転換系) を1回洗い、そして $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ の全ペプチドの存在下又は非存在下でRPMI/5%のFCSの中で $3 \times 10^5/\text{ml}$ において10mlの容量に再懸濁した。

b. 標的細胞のラベリング: 標的細胞を遠心し、そして $200 \mu\text{l}$ /チューブのクロム酸 ( $^{51}\text{Cr}$ ) ナトリウム (NEN) の中に再懸濁し、次いで37℃で1時間シェーカー上でインキュベートした。標的をRPMI/10%のFCSで3回洗い (10ml/洗浄)、そして10mlに再懸濁した (ラベリングの効率を決定するため、 $50 \mu\text{l}$ /標的をMicromedic自動ガンマカウンターで計測した)。

c. CTLアッセイ。標的細胞を $2 \times 10^5/\text{ml}$ に合わせ、そして $50 \mu\text{l}$ の細胞培養物をU底96穴プレート (Costar Corp.) の各ウェルに $1 \times 10^4$ /ウェルの最終濃度で加えた。K 562細胞を1回洗い、 $4 \times 10^6/\text{ml}$ に再懸濁し、そして $50 \mu\text{l}$ /ウェルを $2 \times 10^5$ /ウェルの最終濃度で加えた (寒冷K 562、対、標的の比は20:1)。応答細胞を1回洗い、 $9 \times 10^6/\text{ml}$ で再懸濁し、そして90:1, 30:1, 1

0:1及び3:1のエフェクター、対、標的の比のために3倍

系列希釈を行った。応答細胞をデユブリケートウェルにおいて $100\mu\text{l}$ の容量で加えた。自発性放出のため、 $50\mu\text{l}$ /ウェルのラベル化標的細胞、 $50\mu\text{l}$ /ウェルのK562及び $100\mu\text{l}$ /ウェルの培地を加えた。最大放出のため、 $50\mu\text{l}$ /ウェルの標的、 $50\mu\text{l}$ /ウェルのK562及び $100\mu\text{l}$ /ウェルの0.1% Triton-X100 (Sigma)を加えた。プレートを1200RPMで5分遠心した。37℃で5時間のインキュベーション後、プレートを再び1200RPMで5分遠心し、そして $100\mu\text{l}$ /ウェルの上清液を回収した。標準ガンマー計測技術 (Micromedic自動ガンマーカウンター; 0.5分/チューブ) を利用し、次式に従ってパーセント比溶解を決定した: %比溶解 = 実験値cpm - 自発放出cpm / 最大放出cpm - 自発放出cpm  $\times 100$ 。

細胞障害アッセイ (CTLアッセイ) は、最も高い2つのエフェクター、対、標的 (E:T) の比での特異的なペプチドで感作した標的のCTLによる溶解がコントロール標的 (即ち、ペプチドなしの標的細胞) の溶解より15%大であるときに陽性と考えた。細胞障害アッセイ (CTLアッセイ) は、最も高い2つのエフェクター、対、標的 (E:T) の比での特異的なペプチドで感作した標的のCTLによる溶解がコントロール標的 (即ち、ペプチドなしの標的細胞) の溶解より6%大であるときボーダーラインにあると考えた。

d. 結果。表示のアレルに結合するペプチドのうちで、49MAGEペプチドの9、45 HIVペプチドの10、25HCVペプチドの3及び20HBVペプチドの2をインビトロでの誘発一次CTLのデーターのために試験した。様々な免疫原ペプチドに対するCTL応答を示す代表的なグラフをMAGE (図22)、HIV (図23)、HCV (図24) 及びHBV (図2) に関して示す。CTL誘発データーは、適当なMHCに結合し、そしてインビトロで一次CTLを誘発する免疫原性ペプチドをリストしている表24にまとめた。表示しているのはペプチドの配列、対応の抗原及

びそれが結合するHLAアレルである。図20に示す結果は、ペプチド感作標的及び内生標的であって低温及びインキュベーション技術によりMAGE3ペプチド1044.07を負荷したSAC-I活性化PBMCによる刺激を経たものの溶解を示す。図21は酸スト

リップ負荷技術（パネルa）と低温インキュベーション技術（パネルb）との対比を示す。

本発明のわかり易さのために具体例及び実施例により多少詳しく説明してきたが、所定の変更及び改良が本発明の範囲を逸脱することなくさせることが明らかであろう。

表 13

CYTELの HLAモチーフのバリデーション

結 合 能 (IC <sub>50</sub> nM)						
Sequence	Motif	A1	A2.1	A3.2	A11	A24
AADKAAAAY	A1	50	--*	--	--	--
ATAKAAAAY	A1	15	--	329	77	--
ATDKAAAAY	A1	2.8	--	9250	840	ND
ALAKAAAAY	A2.1	--	125	--	--	--
AMAAAAAAK	A3.2	--	--	48	8.4	--
ATAAAAAAK	A11	--	--	59	40	--
AYAKAAAF	A24	--	--	--	--	115

\*A：ダッシュは20,000nMより大のIC<sub>50</sub>を示す。

表 14

CYTEL の HLAモチーフのバリデーション

結 合 能 (IC <sub>50</sub> nM)						
SEQUENCE	MOTIF	A1	A2.1	A3.2	A11	
AADKAAAAY	A1	45	-- *	--	--	
ATAKAAAAY	A1	58	--	1100	1030	
ATDKAAAAY	A1	4.0	--	10000	4533	
ALAKAAAAY	A2.1	ND	1400	--	--	
AMAAAAAAK	A3.2	ND	--	85	24.0	
ATAAAAAAK	A11	--	--	216	88	

\*A：ダッシュは20,000nMより大のIC<sub>50</sub>を示す。

表 15  
HLA-A3.2

ペプチド	配 列	952.25に対する平均比	置 換
952.25	ALAAAAAAK	1	—
952.26	AMAAAAAAK	1.2	位置 2
952.23	AVAAAAAAK	0.95	
981.04	ASAAAAAAK	0.89	
952.24	AIAAAAAAK	0.57	
952.27	AAAAAAAK	0.57	
981.06	ATAAAAAAK	0.49	
981.08	AFAAAAAAK	0.13	
981.09	AGAAAAAAK	0.077	
981.13	ACAAAAAAK	0.031	
981.12	ADAAAAAAK	0.014	
981.11	ANAAAAAAK	0.0010	
981.05	AKAAAAAAK	<0.0016	
981.07	AYAAAAAAK	<0.0005	
981.10	APAAAAAAK	<0.0006	
952.35	ALAAAAAAR	0.46	位置 9
981.36	ALAAAAAAY	0.15	
981.33	ALAAAAAAA	0.0034	
981.35	ALAAAAAAQ	<0.0006	
981.37	ALAAAAAAS	<0.0005	
981.38	ALAAAAAAT	<0.0005	
981.34	ALAAAAAAN	<0.0005	
981.39	ALAAAAAAE	<0.0003	

表 16

HLA-A11

ペプチド	配 列	952.25に対する平均比	置 換
952.25	ALAAAAAAK	1	—
952.26	AMAAAAAAK	2.5	位置 2
952.27	AAAAAAAK	1.1	
952.24	ALAAAAAAK	0.72	
981.06	ATAAAAAAK	0.55	
981.04	ASAAAAAAK	0.46	
981.09	ACAAAAAAK	0.38	
952.23	AVAAAAAAK	0.23	
981.11	ANAAAAAAK	0.23	
981.13	ACAAAAAAK	0.019	
981.08	AFAAAAAAK	0.020	
981.12	ADAAAAAAK	0.012	
981.05	AKAAAAAAK	0.0065	
981.07	AYAAAAAAK	<0.0065	
981.10	APAAAAAAK	<0.0051	
952.35	ALAAAAAAR	0.015	位置 9
981.33	ALAAAAAAA	<0.0059	
981.34	ALAAAAAAN	<0.0071	
981.35	ALAAAAAAQ	<0.0051	
981.36	ALAAAAAAY	<0.0071	
981.37	ALAAAAAAS	<0.0051	
981.38	ALAAAAAAT	<0.0051	
981.39	ALAAAAAAE	<0.0071	



表 17

HLA-A24

ペプチド	配 列	983.01に対する平均比	置 換
983.01	AYAKAAAF	1	—
983.08	AFAKAAAF	0.24	位置 2
983.09	APAKAAAF	0.0058	
983.10	AAAKAAAF	0.0023	
983.11	AKAKAAAF	<0.0012	
983.05	AYAKAAAI	0.20	位置 9
983.04	AYAKAAAL	0.11	
983.06	AYAKAAAV	0.0023	
983.02	AYAKAAAA	<0.0012	
983.03	AYAKAAAY	<0.0012	
983.07	AYAKAAAK	<0.0012	

表 18

HLA-A1

ペプチド	配 列	982.07に対する平均比	置 換
982.011	ATDKAAAAAY	モチーフ	—
982.07	ATAKAAAAAY	1	—
982.09	ASAKAAAAAY	0.17	位置 2
982.13	AMAKAAAAAY	0.095	3 位に D なし
982.08	AAAKAAAAAY	0.0064	
954.09	ALAKAAAAAY	0.0045	
954.11	ALAKAAAAAY	0.0045	
954.13	AVAKAAAAAY	0.0020	
982.10	AKAKAAAAAY	0.0011	
982.11	ANAKAAAAAY	<0.0001	
982.12	ADAKAAAAAY	<0.0001	
982.14	AGAKAAAAAY	<0.0001	
982.15	APAKAAAAAY	<0.0001	
982.16	AYAKAAAAAY	<0.0001	
982.17	AHAKAAAAAY	<0.0001	
982.24	ATAKAAAAA	0.0040	位置 9
982.23	ATAKAAAAF	0.0019	3 位に D なし
982.28	ATAKAAAAH	0.0010	
982.32	ATAKAAAAV	0.0005	
982.25	ATAKAAAAAN	<0.0001	
982.26	ATAKAAAAAD	<0.0001	
982.27	ATAKAAAAAW	<0.0001	
982.30	ATAKAAAAK	<0.0001	
982.31	ATAKAAAAI	<0.0001	
982.29	ATAKAAAAP	<0.0001	

表 19

HLA-A1

ペプチド	配 列	982.07に対する平均比	置 換
982.01	ATDKAAAAAY	モチーフ	—
982.07	ATAKAAAAAY	1	—
982.01	AADKAAAAAY	0.14	位置3
954.03	AAEKAAAAAY	0.038	2位にTなし
982.02	AAAKAAAAAY	0.0055	
982.06	AASKAAAAAY	0.0024	
982.04	AANKAAAAAY	0.0011	
982.03	AAQKAAAAAY	0.0008	
982.05	AAKKAAAAAY	<0.0001	
982.20	AADKAAAAA	0.0016	位置9
982.21	AADKAAAAW	0.0005	2位にTなし
982.19	AADKAAAAF	<0.0001	
982.22	AADKAAAAK	<0.0001	

表 20 (A)

HLA-A1に対するHPV16 E6及びE7ペプチドの結合

起源	第1aa の位置	配 列*	標準に対す る結合比↓	モチーフ の相定
E 6	80	ISEYRHYAY	3.500	+
E 6	69	VADKALKFY	0.240	+
E 7	44	QAEPDRAHY	0.029	+
E 7	37	EIDGPAGQA	0.025	-
E 7	19	TTDLYAYEQ	0.023	+
E 6	144	MSAARSSRT	0.019	+/-
E 7	73	HVDIRTLED	0.014	-
E 6	139	WTGRAMSAA	0.010	-
E 6	61	YRDGNPYAV	0.008	-

\* 字体Aはシステインがアラニンに置き代っている残基を意味する。

↓ この表において考慮する実験巾の平均IC<sub>50</sub>値±標準のSEは81±30nMである。表には≥0.001 の比の値をもたらすペプチドを記載。その他の全てのペプチドは≤0.001 の比の値をもたらした。

表 20 (B)

HLA-A3.2に対するHPV16 E6及びE7ペプチドの結合

起源	第一aa の位置	配 列 *	標準に対す る結合比 †	モチーフ の相定
E 6	107	LIRAINAQK	3.7000	+
E 6	59	IVYRDGNPY	3.0000	+
E 7	89	IVAPIASQK	2.2000	+
E 6	33	IILEAVYAK	1.5000	+
E 6	125	HLDDKKQRFH	0.4400	+
E 6	143	AMSAARSSR	0.1800	+
E 6	7	AMFQDPQER	0.1000	+
E 6	93	TTLEQQYNK	0.0780	+
E 6	37	AVYAKQQLL	0.0320	—
E 7	51	HYNIPTFAA	0.0210	—
E 6	145	SAARSSRTR	0.0200	+
E 6	75	KFYSKISEY	0.0100	+
E 6	89	SLYGTTLLEQ	0.0080	—
E 7	52	YNIPTFAAK	0.0067	—
E 6	80	ISEYRHYAY	0.0064	+
E 6	42	QQLLRREYV	0.0058	—
E 6	68	AVADKALKF	0.0056	+
E 6	97	QQYNKPLAD	0.0045	—
E 6	79	KISEYRHYA	0.0044	—
E 6	84	RHYAYSLYG	0.0036	—
E 6	69	VADKALKFY	0.0025	+
E 6	146	AARSSRTRR	0.0020	+
E 7	58	AAKADSTLR	0.0016	+
E 6	38	VYAKQQLLR	0.0012	—
E 6	67	YAVADKALK	0.0012	+
E 7	60	KADSTLRRLA	0.0012	—

\* 字体 A はシステインがアラニンに置き代っている残基を意味する。

† この表において考慮する実験巾の平均 IC<sub>50</sub>。値 ± 標準の SE は 30 ± 3 nM である。表には ≥ 0.001 の比の値をもたらすペプチドを記載。その他の全てのペプチドは ≤ 0.001 の比の値をもたらした。

表 20 (C)

HLA-A11.2に対するHPV16 E6及びE7ペプチドの結合

起源	第一aa の位置	配 列*	標準に対す る結合比 †	モチーフ の相定
E 6	33	IILEAVYAK	6.7000	+
E 6	93	TTLEQQYNK	1.8000	+
E 7	89	IYAPIASQK	1.3000	+
E 6	7	AMFQDPQER	0.8400	+ / -
E 6	59	IYYRdGNPY	0.4700	- (+) §
E 6	80	ISEYRHYAY	0.4300	- (+) §
E 6	37	AVYAKQQLL	0.0450	-
E 6	145	SAARSSRTR	0.0330	+ / -
E 6	107	LIRAIINAQK	0.0120	+
E 7	58	AAKADSTLR	0.0110	+ / -
E 6	42	QQLLRREYV	0.0084	+ / - (+) §
E 6	143	ANSAARSSR	0.0084	-
E 6	79	KISEYRHYA	0.0076	-
E 6	67	YAVADKALK	0.0074	+
E 7	52	YNIVTFAAK	0.0060	+
E 6	68	AVADKALKF	0.0037	-
E 6	69	VADKALKFY	0.0030	- (+) §
E 6	38	VYAKQQLLR	0.0022	+ / -
E 6	140	TGRAMSAAR	0.0012	+
E 7	90	VAPIASQKP	0.0012	-
E 7	51	HYNIVTFAA	0.0010	-

\* 字体 A はシステインがアラニンに置き代っている残基を意味する。

† この表において考慮する実験中の平均 IC<sub>50</sub> 値 ± 標準の SE は 10 ± 3 nM である。表には ≥ 0.001 の比の値をもたすペプチドを記載。その他の全てのペプチドは ≤ 0.001 の比の値をもたした。

§ かつこは調整モチーフに従う点数を示す。

表 20 (D)

HLA-A24 に対する HPV16 E6及びE7ペプチドの結合

起源	第一aa の位置	配 列 *	標準に対す る結合比 †	モチーフ の相定
E 6	87	AYS <sup>A</sup> LYGTTL	0.1200	+
E 6	72	KALKFYSKI	0.1100	- (+) §
E 6	131	RFHNIRGRW	0.1000	+
E 7	49	RAHYNIVTF	0.0670	- (+) §
E 6	49	VYDFAFRDL	0.0610	+
E 6	82	EYRHYAYSL	0.0460	+
E 6	26	LQTTIHDI I	0.0200	-
E 6	66	PYAVADKAL	0.0055	-
E 6	1	MHQKRTAMF	0.0049	-
E 6	85	HYAYS <sup>A</sup> LYGT	0.0037	-
E 6	44	LLRREVYDF	0.0023	+
E 6	38	VYAKQQLLR	0.0011	-

\* 字体 A はシステインがアラニンに置き代っている残基を意味する。

† この表において考慮する実験中の平均 IC<sub>50</sub> 値 ± 標準の SE は 22 ± 6 nM である。表には ≥ 0.001 の比の値をもたらすペプチドを記載。その他の全てのペプチドは ≤ 0.001 の比の値をもたらした。

§ かつこは調整モチーフに従う点数を示す。

表 20 (E)  
2. (3). 9 アンカーモチーフの能力のまとめ

モチーフを有する バインダー のパーセンテージ	A 1		HLA アレル A 3, 2		A 11, 2		A 24	
	推定/実験		推定/実験		推定/実験		推定/実験	
高 ( $\geq 0.1$ )	2	2(100%)	7	7(100%)	6	6(100%)	2	3 (67%)
中 ( $0.1 \sim 0.01$ )	3	6(50%)	3	5(60%)	3	4(75%)	2	4 (50%)
弱 ( $0.01 \sim 0.001$ )	0	1(0%)	6	14(43%)	6	11(55%)	1	5 (20%)
ネガティブ ( $\leq 0.001$ )	7	231(3%)	16	214(7%)	14	219(6%)	2	228 (1%)
総	12	240	32	240	26	240	7	240



表 21 (A)  
A 3. 2 9-量体最適モチーフ

9-量体	良好バインダー	中間的バインダー	弱バインダー	非バインダー	総
IK	3( 15 %)	4( 20 %)	7( 35 %)	6( 30 %)	20 (100 %)
IR	3(15. 8%)	4(21. 1%)	7(36. 8%)	5(26. 3%)	19 (100 %)
LK	13(48. 1%)	6(22. 2%)	5(18. 5%)	3(11. 1%)	27 (100 %)
LR	4( 8. 5%)	9(19. 1%)	20(42. 6%)	14(29. 8%)	47 (100 %)
SK	0	0	0	0	0
SR	0	0	0	1(100 %)	1 (100 %)
TK	3( 15 %)	6( 30 %)	7( 35 %)	4( 20 %)	20 (100 %)
TR	2(16. 7%)	1( 6. 0%)	2(16. 7%)	7(58. 3%)	12 (100 %)
VK	9(28. 1%)	13(40. 6%)	9(28. 1%)	1( 3. 1%)	32 (100 %)
VR	2( 7. 4%)	3(11. 1%)	14(51. 9%)	8(29. 6%)	27 (100 %)
総	39( 19 %)	46(22. 4%)	71(34. 6%)	49(23. 9%)	205 (100 %)

表 21 (B)  
A11 9-量体最適モチーフ

9-量体	良好バインダー	中間的バインダー	弱バインダー	非バインダー	総
GK	0	1(100%)	0	0	1(100%)
IK	5(25%)	5(25%)	7(35%)	3(15%)	20(100%)
LK	6(22.2%)	10(37%)	9(33.3%)	2(7.4%)	27(100%)
TK	10(50%)	4(20%)	4(20%)	2(10%)	20(100%)
WK	12(37.5%)	15(46.9%)	4(12.5%)	1(3.1%)	32(100%)
総	33(33%)	35(35%)	24(24%)	8(8%)	100(100%)

表 22 (A)  
A3.2 10-量体最適モナー

10-量体	良好バインダー	中間的バインダー	弱バインダー	非バインダー	総
AK	1(33.3%)	1(33.3%)	1(33.3%)	0	3 (100%)
AR	0	0	1(100%)	0	1 (100%)
FK	0	0	0	0	0
FR	0	0	1(25%)	3(75%)	4 (100%)
IK	0	6(27.3%)	10(45.5%)	6(27.3%)	22 (100%)
IR	1(7.1%)	1(7.1%)	2(14.2%)	10(71.4%)	14 (100%)
LK	16(53.3%)	7(23.3%)	5(16.7%)	2(6.7%)	30 (100%)
LR	4(12.5%)	9(28.1%)	11(34.3%)	8(25%)	32 (100%)
MK	1(100%)	0	0	0	1 (100%)
MR	1(100%)	0	0	0	1 (100%)
TK	2(11.8%)	5(29.4%)	8(47.1%)	2(11.8%)	17 (100%)
TR	1(4.8%)	1(4.8%)	9(42.9%)	10(47.6%)	21 (100%)
VK	7(35%)	4(20%)	5(25%)	4(20%)	20 (100%)
VR	0	6(21.4%)	15(53.6%)	7(25%)	28 (100%)
総	34(17.5%)	40(20.6%)	68(35.1%)	52(26.8%)	194 (100%)

表 22 (B)  
A11 10-量体最適モーター

10-量体	良好バインダー	中間的バインダー	弱バインダー	非バインダー	総
AK	1(33.3%)	1(33.3%)	1(33.3%)	0	3(100%)
CK	0	0	1(100%)	0	1(100%)
GK	0	0	0	0	0
IK	4(18.2%)	5(22.7%)	12(54.5%)	1(4.5%)	22(100%)
LK	9(30%)	12(40%)	8(26.7%)	1(3.3%)	30(100%)
MK	1(100%)	0	0	0	1(100%)
TK	6(35.3%)	5(29.4%)	5(29.4%)	1(5.9%)	17(100%)
VK	7(35%)	8(40%)	4(20%)	1(5%)	20(100%)
総	28(29.8%)	31(33%)	31(33%)	4(4.3%)	94(100%)

表 23 (A)

符号	配列	AA	ウイルズ	株	分子	位置	4-7	A1	A21	A32	A11	A24
1000	ILDMIRLY	9	c-E882			42	1	9.1		0.03	0.003	
1004	LDHRELY	9	c-E882			869	1	7.6		0.003	0	
1005	GTOLFDY	9	c-E882			104	1	0.16		0	0.03	
1005	LTCSPEDY	9	c-E882			131	1	0.13		0	0.001	
1007	ETRETCY	9	c-E882			401	1	0.003		<0.002	<0.002	
1008	QLVQDLY	9	c-E882			795	1	0.004		0.01	0.037	
1009	FTIISDWSY	10	c-E882			899	1	2.7		0.003	0.035	
1007	TLERECY	10	c-E882			868	1	1.3		0.007	0	
1007	TYMAGNSY	10	c-E882			402	1	1.1		0	0	
1007	YVAGNSY	10	c-E882			772	1	1.1	0	0.01	0.02	0
1004	GTALNENY	10	c-E882			139	1	0.03		<0.002	0.032	
1004	RVLQDLY	10	c-E882			545	1	<0.005		0.05	0.056	
1005	LVQCNLEY	10	c-E882			154	1	0.00		0.007	<0.002	
1005	LVQCNLEY	10	c-E882			55	1	0.008		0.003	0.011	
1006	MDLVNMY	10	c-E882			104	1	0.012		<0.002	<0.002	
1008	MDLVNMY	9	c-E882			681	3.11			0.7	0.014	
1007	LVQCNMY	9	c-E882			669	3.11			0.11	0.27	
1004	LVQCNMY	9	c-E882			852	3.11			0.48	0.00	
1005	VLEBNSY	9	c-E882			754	3.11			0.47	0.03	
1009	VLKESY	9	c-E882			673	3.11			0.38	0.002	
1001	ILWQDLY	5	c-E882			147	3.11			0.38	0.31	
1003	KTFQDLA	5	c-E882			860	3.11			0.17	0.24	
1009	QVCFQDLA	5	c-E882			648	3.11			0.002	0.089	
1003	QVCFQDLA	5	c-E882			34	3.11			0.002	0.03	
1003	LVQCNMY	5	c-E882			856	3.11			0.07	<0.005	
1006	CVCSCQDLA	5	c-E882			538	3.11			0.005	0.03	
1003	LVQCNMY	5	c-E882			718	3.11			0.004	0.023	
1003	LVQCNMY	5	c-E882			214	3.11			0.008	0.004	
1004	LVQCNMY	5	c-E882			312	3.11			<0.002	0.034	
1004	LVQCNMY	5	c-E882			607	3.11			0.003	0.019	
1007	TLWQDLY	10	c-E882			168	3.11			0.003	0.00	
1007	TLWQDLY	10	c-E882			357	3.11			0.003	0.01	
1007	TLWQDLY	10	c-E882			252	3.11			0.02	0.01	
1007	TLWQDLY	10	c-E882			373	3.11			0.38	0.22	
1007	TLWQDLY	10	c-E882			161	3.11			0.79	0.03	
1007	TLWQDLY	10	c-E882			400	3.11			0.18	0	
1007	TLWQDLY	10	c-E882			627	3.11			0.14	0.14	
1007	TLWQDLY	10	c-E882			968	3.11			0.003	0.12	

表 23 (A)

符号	配列	AA	ウイルス	株	分子	位置	チ-7	A1	A21	A32	A11	A24
1021	KUKETELK	10	c-ER32			713	3.11			0.057	0.11	
1045	VLYSPNIVK	10	c-ER32			851	3.11			0.082	0.072	
1131	SVFQNLQVIR	10	c-ER32			423	3.11			0.017	0.075	
1133	HTVWVQLEF	10	c-ER32			478	3.11			0.0085	0.077	
1127	ILKGCVLQR	10	c-ER32			148	3.11			0.040	0.0005	
1143	LYSESRMAR	10	c-ER32			972	3.11			0.0072	0.03	
1136	GVVFGLIKR	10	c-ER32			666	3.11			0.018	0.033	
1026	CVARCSGVK	10	c-ER32			596	3.11			0.022	0.0042	
1137	VVRGLIKRN	10	c-ER32			669	3.11			0.0080	0.016	
1028	GLIKRQOK	10	c-ER32			672	3.11			0.015	0.0014	
1129	RTVCAGCCAR	10	c-ER32			217	3.11			0.0068	0.013	
1134	GLACHQLCAR	10	c-ER32			506	3.11			0.011	0	
1139	KIPVAKVLR	10	c-ER32			747	3.11			0.0039	0.0039	

表 23 (b)

イサド	配列	AA	サイクルス	株	分子	位置	チ-7	A1	A2.1	A3.2	A11	A2.4
1.0291	VCBADYREY	9	EHNAI			409	1	0.016				
1.0295	PIRESYCY	5	EHNAI			553	1	0.010				
1.0681	PVGEADYREY	10	EHNAI			408	1	0.015				
1.0683	CTWVACVIFY	10	EHNAI			501	1	0.014				
1.0293	GVFVYGGCK	5	EHNAI			506	3.11			0.30	0.61	
1.1016	KISLYNDR	5	EHNAI			514	3.11			0.31	0.12	
1.0297	AKDLVATK	5	EHNAI			578	3.11			0.048	0.024	
1.0687	QTILFAVLIK	10	EHNAI			567	3.11			0.010	0.21	
1.1174	CTALAIPOCR	10	EHNAI			523	3.11			0.023	0.056	

表 23 (c)

コード	配列	AA	サイズ	株	分子	位置	値	A1	A2.1	A3.2	A11	A2.4
5.005	CTELKSPY	9	FLU	A	NP	44	1	3.6				
5.006	STLEKSPY	9	FLU	A	NP	37	1	0.020				
5.004	ILJGSAVAK	9	FLU	A	NP	765	3		1.5	0.007		
5.001	RKONKCK	9	FLU	A	NP	221	3		0.27	0.062		
5.006	LKQGSTLR	9	FLU	A	NP	166	3		0.031	0.10		
5.008	MDGCHRY	9	FLU	A	NP	32	3		0.059	0.0010		
5.009	MYLSAFDER	9	FLU	A	NP	65	3		0.016	0.041		
5.004	YQMKTEK	9	FLU	A	NP	40	3		0.031	0.060		
5.004	CINDRNFVA	9	FLU	A	NP	200	3		0.0028	0.024		
5.004	SLMGSTLPR	10	FLU	A	NP	165	3		0.12	0.54		
5.005	KMDGCHRY	10	FLU	A	NP	31	3		0.50	0.0579		
5.006	LLRQSAVAK	10	FLU	A	NP	764	3		0.36	0.037		
5.002	REGNACAAVAK	10	FLU	A	NP	175	3		0.019	0.0346		
5.005	STLEKSPY	10	FLU	A	NP	376	3		0.018	0.016		
5.003	RRYWAIFR	10	FLU	A	NP	382	3		0.012	0		
5.001	RYVLSAFDER	10	FLU	A	NP	65	3		0.0014	0.010		
5.006	YQMKTEK	9	FLU	A	NP	39	24					2.9
5.000	AYEMCNIL	9	FLU	A	NP	216	24					0.037
5.012	REYQMKTEK	10	FLU	A	NP	38	24					0.15



表 23 (d)

分子	位置	A1	A2.1	A2.2	A11	A2.4
1053 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0	0
1064 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.0037	0.006
1023 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.0068	0
1024 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.0068	0
1034 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0	0
1035 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0	0
1036 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.0033	0.0025
1046 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.30	0.014
2027 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.67	0
2028 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.67	0
2029 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.64	0
2012 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.15	0
2019 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.095	0
1014 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1015 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1016 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1017 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1018 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1019 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1020 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1021 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1022 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1023 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1024 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1025 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1026 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1027 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1028 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1029 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1030 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1031 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1032 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1033 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1034 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1035 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1036 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1037 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1038 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1039 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1040 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1041 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1042 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1043 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1044 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1045 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1046 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1047 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1048 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1049 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1050 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1051 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1052 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1053 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1054 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1055 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1056 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1057 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1058 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1059 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002
1060 LIDTASALY	9	IBV	adn	adn	0.017	0.002

表 23 (d)

イテド	配列	AA	ウイリス	株	分子	位置	イ-フ	A1	A21	A3.2	A11	A24
2006	K350 ELSLEY	10	11V	adw	POL	1061	1	0.016				
2010	N1VYELLLEY	10	11V	adw	POL	1069	1	0.015				
2009	L1VOTFERK	9	11V	adw	POL	1094	3		1.8	0.64		
2016	IMAFATFN	9	11V	apw		703	3		0.99	1.5	0.025	
2002	CLIDSEWER	9	11V	apw	POL	867	3		0.14	0.025		
5056	SALCSEWER	9	11V	apw	POL	531	3		<0.003	0.027		
2027	HLIDIDIKX	9	11V	apw	POL	686	3		0.041	0.0075		
2019	SLIDSHIOK	10	11V	apw	POL	1197	3		0.36	4.2		
2024	SAVIFCCICX	10	11V	adw/adw		285	3		0.49	1.9		
5007	OAFFERTRK	10	11V	apw	POL	265	3		1.1	1.79		
2014	L1VOTFERK	10	11V	apw	POL	1081	3		0.19	0.071		
2015	WADDFWCAK	10	11V	apw	POL	1123	3		0.16	0.0076		
2004	TKALCSWOR	9	11V	adw	POL	380	3		0.006	0.03		
2004	PTKATFCX	9	11V	adw	POL	1283	11		0.002	0.016		
2006	PTKATFCX	9	11V	adw	TY	1552	11					
2009	LYAANTFE	9	11V	adw		1330	24					
2006	LYAANTFE	9	11V	adw		1169	24					
2006	PENLITVX	9	11V	adw		689	24					
2005	LYSEITVSE	9	11V	adw		565	24					
2004	PKYQVTCOL	9	11V	apw		718	24					
2009	PKYQVTCOL	9	11V	adw		218	24					
2004	LYSEITVSE	9	11V	adw		566	24					
2009	LYSEITVSE	9	11V	adw		536	24					
2004	LYNLSHTE	9	11V	adw		568	24					
2004	LYNLSHTE	9	11V	adw		581	24					
2006	NYKSHNFE	9	11V	adw		743	24					
2006	NYKSHNFE	9	11V	adw/adw		714	24					
2007	HYRTHNHL	9	11V	adw		724	24					
2006	GYVADLELY	9	11V	ALL		1224	24					
2002	ATVTHNNT	9	11V	adw	NUCNUCERIS	131	24					
2004	LYVTHNNT	9	11V	apw		1089	24					
2003	STQTHNLE	9	11V	adw		687	24					
2001	LYSHNLE	10	11V	ALL		1087	24					
2002	LYSHNLE	10	11V	adw		1469	24					
2003	LYSHNLE	10	11V	adw		1241	24					
2004	LYSHNLE	10	11V	adw		947	24					
2004	STQTHNHL	10	11V	adw/adw		598	24					



表 23 (d)

イナ	配列	AA	ウエルス	株	分子	位置	イナ	A1	A21	A12	A11	A24
1102	MULTIPLEX	9	1102	adw	POL	1094	3.11			0.06	0.002	
1103	TYROPHAN	9	1103	adw	POL	64	3.11			0.08	0.027	
1104	TYROPHAN	9	1104	adw	POL	1386	3.11			0.04	0.001	
1105	LYSINE	9	1105	adw	POL	1407	3.11			0.01	0	
1106	LYSINE	9	1106	adw	COHE	599	3.11			0.003	0.020	
1107	LYSINE	9	1107	adw	POL	1022	3.11			0.006	0.015	
1108	LYSINE	9	1108	adw	COHE	64	3.11			0.013	0.011	
1109	LYSINE	9	1109	adw	POL	1424	3.11			0.007	0.010	
1110	LYSINE	9	1110	adw	POL	1385	3.11			0.004	0.010	
1111	LYSINE	9	1111	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1112	LYSINE	9	1112	adw	POL	64	3.11			0.007	0.010	
1113	LYSINE	9	1113	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1114	LYSINE	9	1114	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1115	LYSINE	9	1115	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1116	LYSINE	9	1116	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1117	LYSINE	9	1117	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1118	LYSINE	9	1118	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1119	LYSINE	9	1119	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1120	LYSINE	9	1120	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1121	LYSINE	9	1121	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1122	LYSINE	9	1122	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1123	LYSINE	9	1123	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1124	LYSINE	9	1124	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1125	LYSINE	9	1125	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1126	LYSINE	9	1126	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1127	LYSINE	9	1127	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1128	LYSINE	9	1128	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1129	LYSINE	9	1129	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1130	LYSINE	9	1130	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1131	LYSINE	9	1131	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1132	LYSINE	9	1132	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1133	LYSINE	9	1133	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1134	LYSINE	9	1134	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1135	LYSINE	9	1135	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1136	LYSINE	9	1136	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1137	LYSINE	9	1137	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1138	LYSINE	9	1138	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1139	LYSINE	9	1139	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1140	LYSINE	9	1140	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1141	LYSINE	9	1141	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1142	LYSINE	9	1142	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1143	LYSINE	9	1143	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1144	LYSINE	9	1144	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1145	LYSINE	9	1145	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1146	LYSINE	9	1146	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1147	LYSINE	9	1147	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1148	LYSINE	9	1148	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1149	LYSINE	9	1149	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1150	LYSINE	9	1150	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1151	LYSINE	9	1151	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1152	LYSINE	9	1152	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1153	LYSINE	9	1153	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1154	LYSINE	9	1154	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1155	LYSINE	9	1155	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1156	LYSINE	9	1156	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1157	LYSINE	9	1157	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1158	LYSINE	9	1158	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1159	LYSINE	9	1159	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1160	LYSINE	9	1160	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1161	LYSINE	9	1161	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1162	LYSINE	9	1162	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1163	LYSINE	9	1163	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1164	LYSINE	9	1164	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1165	LYSINE	9	1165	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1166	LYSINE	9	1166	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1167	LYSINE	9	1167	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1168	LYSINE	9	1168	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1169	LYSINE	9	1169	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1170	LYSINE	9	1170	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1171	LYSINE	9	1171	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1172	LYSINE	9	1172	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1173	LYSINE	9	1173	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1174	LYSINE	9	1174	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1175	LYSINE	9	1175	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1176	LYSINE	9	1176	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1177	LYSINE	9	1177	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1178	LYSINE	9	1178	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1179	LYSINE	9	1179	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1180	LYSINE	9	1180	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1181	LYSINE	9	1181	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1182	LYSINE	9	1182	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1183	LYSINE	9	1183	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1184	LYSINE	9	1184	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1185	LYSINE	9	1185	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1186	LYSINE	9	1186	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1187	LYSINE	9	1187	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1188	LYSINE	9	1188	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1189	LYSINE	9	1189	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1190	LYSINE	9	1190	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1191	LYSINE	9	1191	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1192	LYSINE	9	1192	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1193	LYSINE	9	1193	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1194	LYSINE	9	1194	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1195	LYSINE	9	1195	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1196	LYSINE	9	1196	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1197	LYSINE	9	1197	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1198	LYSINE	9	1198	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1199	LYSINE	9	1199	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	
1200	LYSINE	9	1200	adw	POL	1179	3.11			0.007	0.010	

表 23 (d)

番号	配列	AA	サイクルス	株	分子	位置	チ-7	A1	A2.1	A3.2	A1.1	A3.4
2.0207	PVCFILTVNEX	10	1BV	gyw	POL	696	3.11			0.0267	0.015	
1.6535	VVCFILTVNEX	10	1BV	ad	POL	693	3.11			0.0369	0.014	
1.1075	RLADGCLNRR	10	1BV	ad	POL	601	3.11			0.013	0.0094	
1.1084	IVLKQCKCR	10	1BV	ad	POL	1185	3.11			0.013	0.0074	
1.0773	PJSSWAFIAK	10	1BV	adw	ENV	314	3.11			-0.0003	0.010	
1.0773	LTVNBNRLK	10	1BV	adw	POL	702	3.11			0.0025	0.0095	

表 23 (e)

符号	配列	AA	ウエルス	株	分子	位置 (nt)	A1	A21	A32	A11	A24
1018	CTGCGDLY	9	HCY		LCRF	1123	1	3.0	0	0.010	
1012	NYDQVLEY	9	HCY		NSI/ENV2	697	1	0.60	0	0.010	
2034	YQDNCNLY	9	HCY			302	1	0.54	0.005	0.003	
2035	LTTRCMVDY	9	HCY			605	1	0.078			
1045	RVCCKMAY	9	HCY		LCRF	2388	1	0.053			
1040	DVCCSMAY	9	HCY		LCRF	2416	1	0.089			
2036	FTIRKRMV	9	HCY			626	1	0.012			
1059	GLASRLSY	10	HCY		LCRF	2888	1	0.41	0.002	0.0034	0.0072
1065	TLLCTHLLY	10	HCY		LCRF	1617	1	0.30	0.11	0.0024	
2037	EYVLLHLL	9	HCY			719	24				1.4
2019	MYGNGEHL	10	HCY			633	24				
2070	EYVLLHLL	10	HCY			719	24				
1039	SVVAELRK	9	HCY		LCRF	1269	3.11	0.016	0.07		0.010
1095	QLTFSPRR	9	HCY		ENV1	290	3.11	0.75	0.05		
1090	RLCYRAIRK	9	HCY		CORE	43	3.11	0.74	0.16		
1023	LIRCSKKK	9	HCY		LCRF	1391	3.11	0.54	0.19		
1022	HLRCSKKK	9	HCY		LCRF	1390	3.11	0.25	0.010		
1092	KTSRSQRR	9	HCY		CORE	51	3.11	0.16	0.064		
1020	AVCRGVAK	9	HCY		LCRF	1183	3.11	0.016	0.036		
1043	EVECVQEK	9	HCY		LCRF	2563	3.11	0.019	0.03		
1037	ITFVSEBK	9	HCY		LCRF	2241	3.11	0.015	0.0079		
1057	CHTSLTCK	9	HCY		LCRF	1042	3.11	0.095	0.011		
1096	CVAGGLVAK	10	HCY		LCRF	1858	3.11	0.87	0.051		
1080	HLIAVTCRCK	10	HCY		LCRF	1227	3.11	0.57	0.051		
1162	RMVCEVIR	10	HCY		NSI/ENV2	632	3.11	0.27	0.012		
1085	HLRCSKKK	10	HCY		LCRF	1390	3.11	0.27	0.025		
1084	TLLCQALPKR	10	HCY		LCRF	1251	3.11	0.17	0.13		
1167	GVGVLLPKR	10	HCY		LCRF	3002	3.11	0.029	0.032		
1103	LEHLLADAR	10	HCY		NSI/ENV2	723	3.11	0.015	0		

表 23 (f)

[illegible]

表 23 (f)

イテ	配列	AA	ウオルス	株	分子	位置 イ-7	A1	A2.1	A3.2	A11	A2.4
1.0015	NDVYDRYK	9	HHV		GAG	289	311		0.0007	0.00	
1.0055	GHQAOYDK	9	HHV		POL	1199	311		<0.0002	0.00	
1.0064	VLFLECDIK	9	HHV		POL	1254	311		0.08	0.03	
1.0076	LVDFLELNK	9	HHV		POL	769	311		0.011	0.03	
1.0078	KVVRERKAK	9	HHV		POL	1513	311		0.079	0.0039	
1.0082	MTKLETRK	9	HHV		POL	859	311		<0.0008	0.016	
1.0083	TYVGGYVWK	10	HHV		ENV	2185	311		3.8	7.8	
1.0018	TYGPRLEK	10	HHV		POL	535	311		0.16	5.6	
1.0047	AVHINPRK	10	HHV		POL	1154	311		0.56	0.85	
1.0047	KVFLDCLDK	10	HHV		POL	1253	311		0.56	0.78	
1.0049	KLVDFLELNK	10	HHV		POL	768	311		0.51	0.90	
1.0049	KLKQCMQDK	10	HHV		POL	768	311		0.39	0.075	
1.0055	FLGKIVSYK	10	HHV		GAG	440	311		0.32	0.024	
1.0056	KICNFRVYK	10	HHV		POL	1174	311		0.032	0.21	
1.0010	GIRHFGALK	10	HHV		POL	788	311		0.011	0.17	
1.0026	LKCYVQCLK	10	HHV		POL	1117	311		0.056	0.082	
1.0085	MISGGGTRK	10	HHV		POL	642	311		0.0099	0.055	
1.0013	MTKLETRK	10	HHV		POL	859	311		0.015	0.038	
1.0043	VWQNSDK	10	HHV		POL	1594	311		<0.0005	0.021	
1.0394	FLGKIVSYK	10	HHV		GAG	440	311		0.00	0.013	
1.1059	VWQNSDK	10	HHV		ENV	2241	311		0.024	0.019	
1.0417	FTTRDKHK	10	HHV		POL	909	311		<0.0002	0.015	
1.0405	LVKCTEK	10	HHV		POL	729	311		0.0002	0.012	
1.0392	LVQANPDK	10	HHV		GAG	377	311		<0.0002	0.011	



表 23 (g)

[illegible]

表 23 (h)

分子	配列	AA	ケムルス	株	分子	位置	A1	A21	A12	A11	A22
1000	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1002	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1003	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1004	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1005	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1006	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1007	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1008	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1009	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1010	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1011	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1012	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1013	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1014	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1015	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1016	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1017	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1018	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1019	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1020	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1021	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1022	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1023	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1024	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1025	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1026	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1027	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1028	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1029	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1030	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1031	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1032	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1033	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1034	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1035	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1036	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1037	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1038	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1039	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1040	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1041	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1042	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1043	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1044	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1045	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1046	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1047	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1048	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1049	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	
1050	EXPRESS	9	MADE	3	181	1	18		0.002	0.002	

表 23 (i)

番号	配列	AA	カイルス	株	分子	位置	単位	A1	A21	A22	A11	A24
0081	CSCTTIV	9	F51			726	1	29.5		0.000	0.079	
1.0827	CTAKSVITY	10	F51			117	1	0.33	0	0.023	0.049	0
1.0827	ROBCLNVEY	10	F53			186	1	0.022		0.0014	0.0000	
1.0278	RVQAMANK	9	F53			166	3.11			1.5	0.73	
1.0278	CTTSVALNK	9	F51			128	3.11			0.46	1.1	
1.0285	NTESSQPK	9	F53			311	3.11			0.009	0.095	
1.0284	ELTEENLR	9	F53			293	3.11			0.0015	0.091	
1.0287	ELTEENLR	9	F53			293	3.11			0.003	0.062	
1.0679	RTEEDLVAK	10	F53			268	3.11			3.5	0.060	
1.1113	KTIQDSQPK	10	F53			101	3.11			2.6	0.86	
1.1113	VWAKTHLR	10	F53			172	3.11			0.099	0.0017	
1.0679	NTESSQPK	10	F53			311	3.11			0.065	0.054	
1.1121	RVCACQPK	10	F53			279	3.11			0.04	0.01	
1.1116	GLAPQHLR	10	F53			187	3.11			0.013	0.006	

表 23 (j)

ペプチド	配列	AA	ウイルス	株	分子	位置	チ-7	A1	A2.1	A3.2	A11	A24
3075	ACETRYDAY	9	FAF			32	1	3.4		-0.002	0.002	0
3074	ACETRYDAY	9	FAF			31	1	0.78		-0.002	0.002	0
3076	ACETRYDAY	9	FAF			31	1	0.77	-0.002	-0.002	0.002	0
3073	ACETRYDAY	9	FAF			31	1	0.94	-0.002	-0.002	0.002	0
3077	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	1.1		0.002	0.002	0
3072	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	1.1		0.002	0.002	0
3078	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.62	0.005	0.015	0.004	0.027
3079	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3076	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3075	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3074	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3073	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3072	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3071	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3070	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3069	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3068	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3067	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3066	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3065	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3064	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3063	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3062	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3061	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3060	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3059	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3058	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3057	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3056	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3055	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3054	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3053	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3052	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3051	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3050	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3049	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3048	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3047	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3046	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3045	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3044	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3043	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3042	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3041	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3040	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3039	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3038	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3037	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3036	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3035	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3034	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3033	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3032	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3031	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3030	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3029	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3028	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3027	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3026	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3025	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3024	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3023	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	
3022	ACETRYDAY	10	FAF			32	1	0.015		0.002	0.002	

表 23 (k)

ペプチド	配列	AA	ウイルス	株	分子	位置	チ-7	A1	A2.1	A3.2	A11	A24
1.0270	ALPERIPPLY	9	PSA			321	1	0.011				
1.0157	YSHRPHPLY	10	PSA			321	1	0.15		-0.002	0.002	
1.0263	ALYKSLIK	9	PSA			321	1			0.24	0.037	
1.0273	YVYVYVYV	9	PSA			321	1			0.002	0.002	
1.0272	YVYVYVYV	9	PSA			321	1			0.002	0.002	
1.1009	SLYKSLIK	9	PSA			321	1			0.002	0.002	
1.0260	YVYVYVYV	9	PSA			321	1			0.002	0.002	
1.0269	YVYVYVYV	9	PSA			321	1			0.002	0.002	
1.1112	SLYKSLIK	10	PSA			321	1			0.002	0.002	
1.0263	YVYVYVYV	10	PSA			321	1			0.002	0.002	
1.0261	YVYVYVYV	10	PSA			321	1			0.002	0.002	
1.0263	YVYVYVYV	10	PSA			321	1			0.002	0.002	
1.1111	YVYVYVYV	10	PSA			321	1			0.002	0.002	
1.0268	YVYVYVYV	9	PSA			321	1			0.002	0.002	

表 24: ペプチドスクリーニングにおいて同定された  
CTL エピトープ

配 列	抗 原	モチーフ	Id
EVDPIGHLV	MAGE3	A01	1044.07
ASSLPTTMNY	MAGE3	A01	1044.01
EADPTGHSY	MAGE1	A01	958.01
SSLPTTMNY*	MAGE3	A01	1072.02*
GSVVGWQY*	MAGE3	A01	1072.03*
ALAETSYVK*	MAGE1N	A03	1072.38*
SLFRAVITK	MAGE1	A11	1072.13
RALAETSYVK	MAGE1N	A11	1072.39
ESLFRVITK	MAGE1	A11	1072.15
KVYLAWPAHK	HIV	A3/11*	1069.42*
TVYYGVPVWK	HIV	A03	1069.43
KLAGRWPK	HIV	A03	1069.44
KMIGGIGGFIK	HIV	A03	1069.45
AIQSSMTK	HIV	A03	966.01
WTYQIYQEPFK	HIV	A03	1069.46
FLGKIWPSHK*	HIV	A03	1069.56*
TVYYGVPVWK	HIV	A11	1052.03
VTYYGVPVWK	HIV	A11	1069.47
GVAGALVAFK	HCV	A03	1073.10
CTCGSSDLY	HCV	A11	1069.62
GVAGALVAFK	HCV	A11	1052.05
LLDTASALY	HBV	A01	1069.01*
TLWKAGILYK	HBV	A03	1069.15
* ボーダライン陽性			

表 25 a

ストリップした自己PBMC及び PHAブラスト上への

負荷のためのCytel により合成したペプチド

ペプチドID*	抗原	配列
777.03	HBs	FLLTRILTI
924.07	HBc	FLPSDFFPSV
927.32	HBp	GLYSSTVPV
938.01	MAGE 1	EADPTGHSY
939.03	PSA	VLVHPQWVL
941.01	HBc	FLPSDYFPSV
1044.04	PAP	ILLWDPIPV
1044.05	PSA	KLQCVDLVHI
1044.06	PSA	MLLRLSEPAEL

表 25 b

細胞集団	<sup>125</sup> I-ラベル化	CPMS	
	ペプチド+/-寒冷	+/- std. dev.	
	ペプチド		
JY 酸ストリップ済	-寒冷ペプチド	3553±157	n = 3
JY 酸ストリップ済	+寒冷ペプチド	13	n = 1
JY コントロール	-寒冷ペプチド	370 ± 37	n = 3
JY コントロール	+寒冷ペプチド	50	n = 1

【図 1】

## H L A-A の精製及びペプチドの分離

細胞起源：抗原  
( $5 \cdot 10 \times 10^6$  細胞当量)

↓  
清浄剤溶解  
( $10^7$  cells/ml)

↓  
清浄剤リゼート

↓  
アフィニティークロマトグラフィー

↓  
精製 H L A-A 抗原

↓  
酸処理

↓  
ペプチド

↓  
配列/モチーフ

- a) EBV 形質転換 B 細胞系  
ホモ接合
- b) HLA-A トランスフェクト体  
e.g. .221-HLA-A1
- c) P815 トランスフェクト体  
(マウス肥満細胞腫)

1% NP-40 又は 1% Renex 30 と  
プロテアーゼインヒビター・1 hr, 4℃

15,000xg, 30min. で遠心

mAb-Sepharose 5 mg/ml  
5-10 ml カラム

期待収量 450-900  $\mu$ g

10%の酢酸, 5 min, 100℃

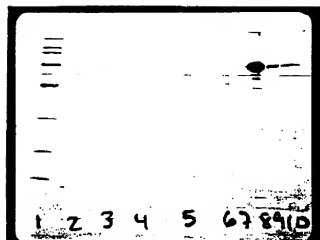
YM 3 濾過, 3 kD カットオフ

D. Hunt - HPLC/EI-TMS  
Cytel - HPLC/ABI 477A

Figure 1

【図2】

FIG. 2.







【図4】

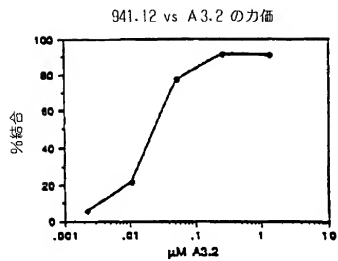


Figure 4

【図5】

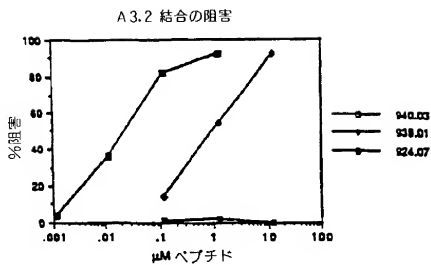


Figure 5

【図6】

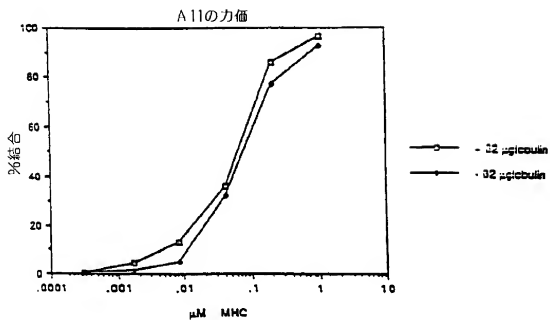


Figure 6

【図7】

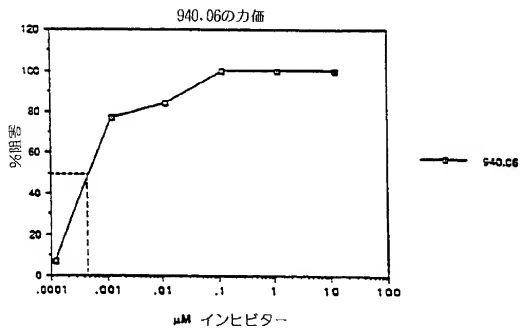


Figure 7

【図8】

## A11 スキャッチャード

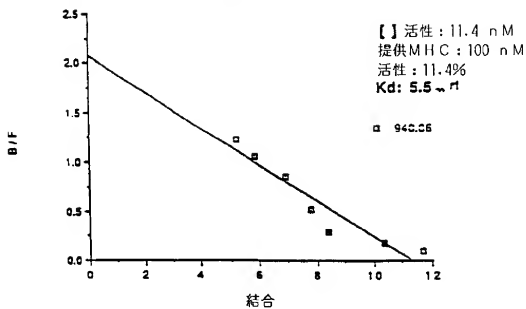


Figure 8

【図9】

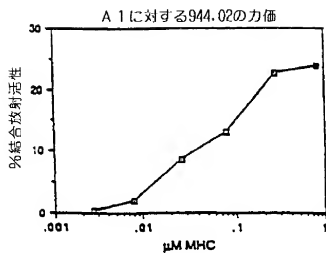


Figure 9

【図10】

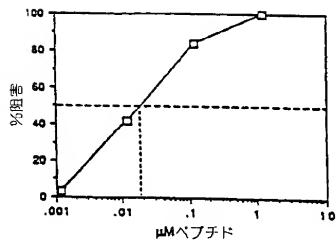
λ<sup>1</sup> 阻害力価検定

Figure 10



【図11】

A 1 vs. 944.02についてのスキャッチャード

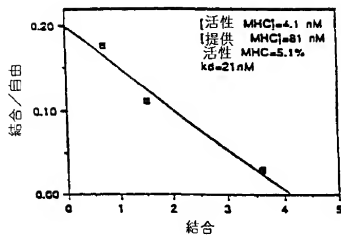


Figure 11

【图 12】

A24 力価検定

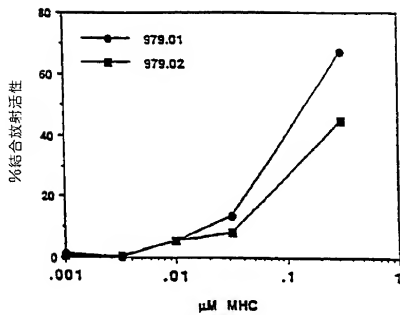


Figure 12

【図13】

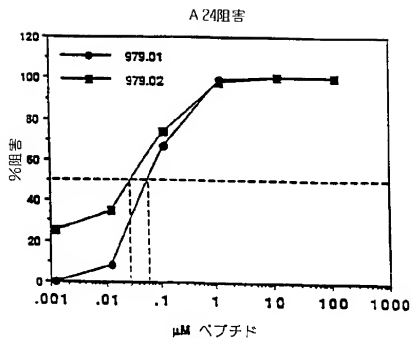
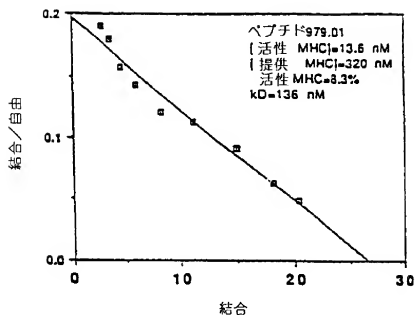


Figure 13

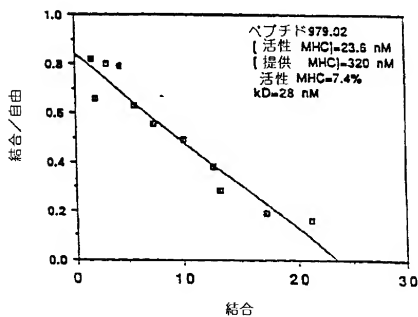
【図14A】

Figure 14A



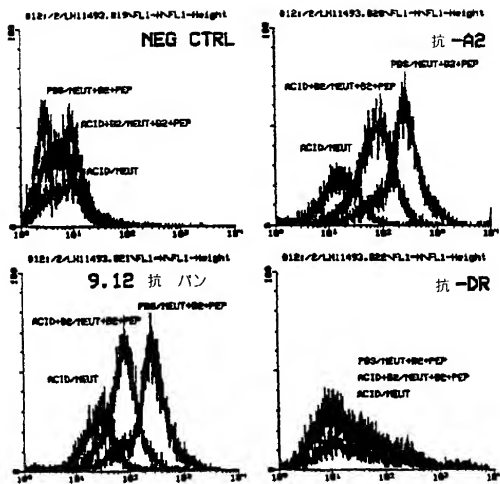
【図14B】

Figure 14B



【図15】

Figure 15



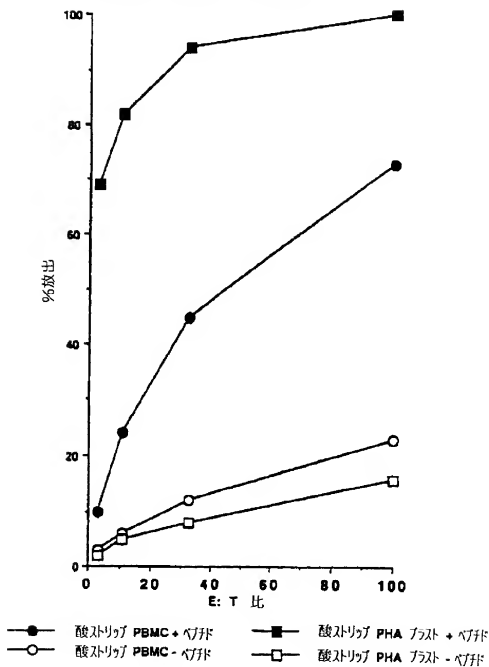
【図16】

Figure 16

CTL 誘発

GC43 A2.1 CD4 枯渴応答体

777.03 + 924.07 + 927.32 プール



【図17】

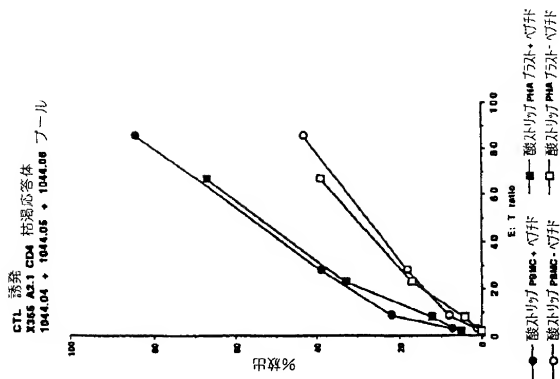
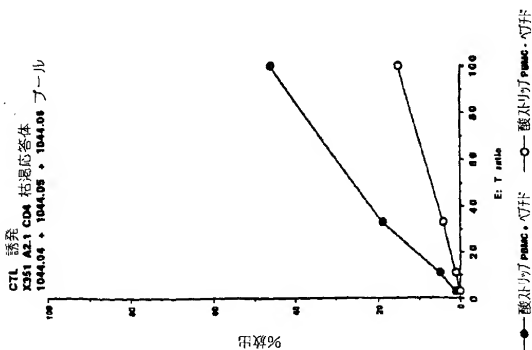
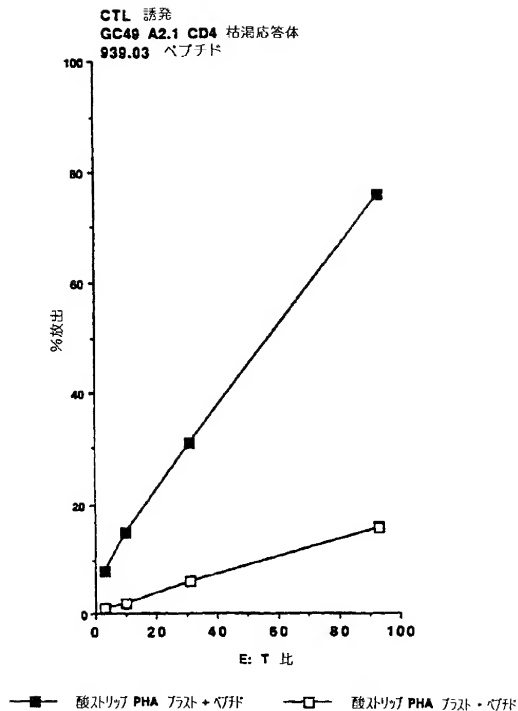


Figure 17



【図18】

Figure 18

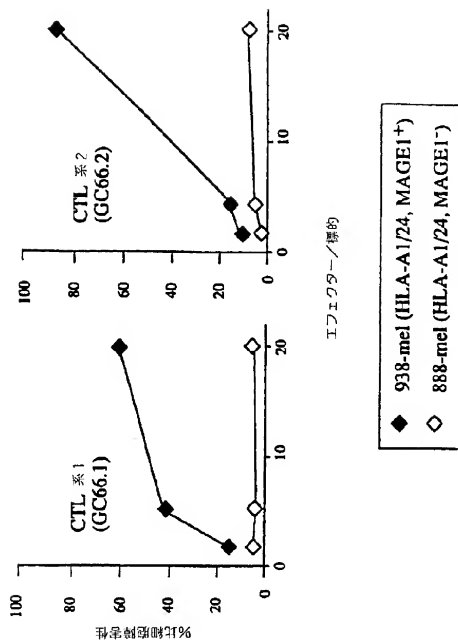




【図19】

Figure 19

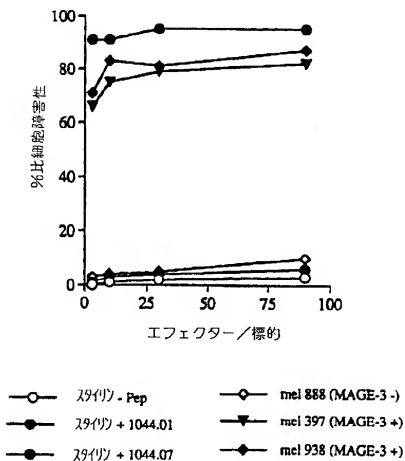
MAGE1ペプチド特異的、HLA-A\*1制限CTLは内生抗原を発現する  
黒色腫細胞を殺傷させる



【図20】

Figure 20

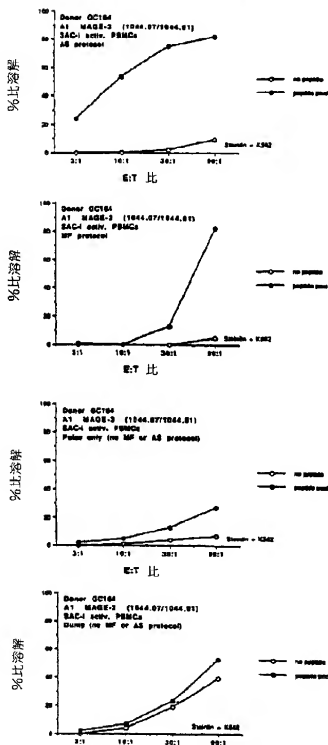
MAGE 3 ペプチド (1044.07) に特異的HLA-A1  
制限CTL系の細胞障害活性



【図21】

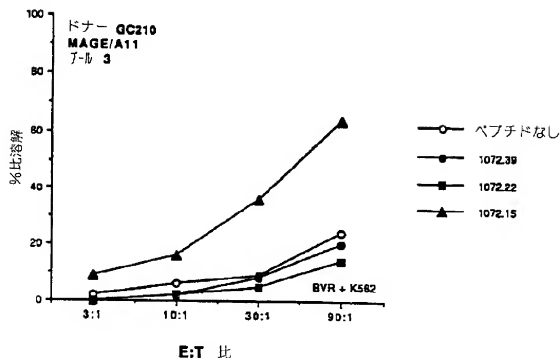
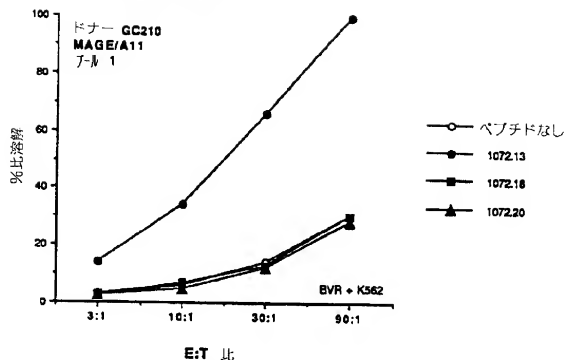
Fig. 21

SAC-1細胞上にペプチドを負荷する種々の方法を用いる誘発



【図22】

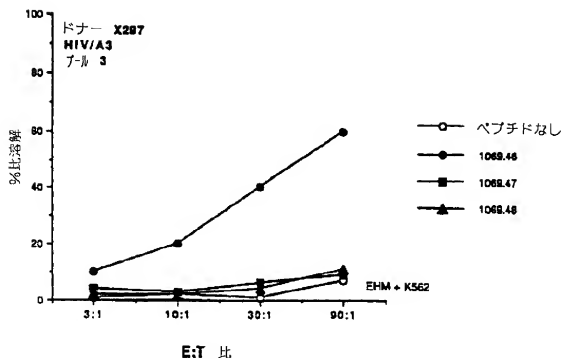
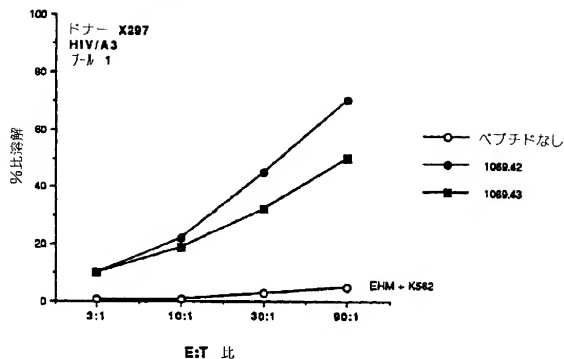
Figure 22  
ペプチドスクリーニング  
MAGE/A11



【図23】

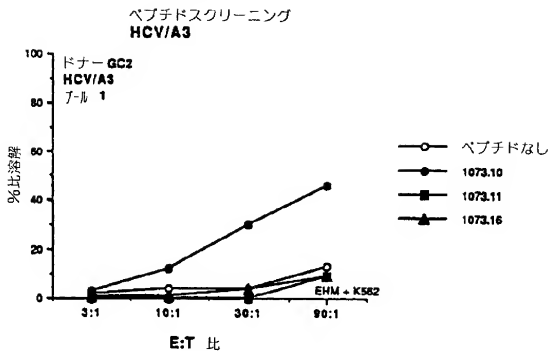
Figure 23

ペプチドスクリーニング  
HIV/A3



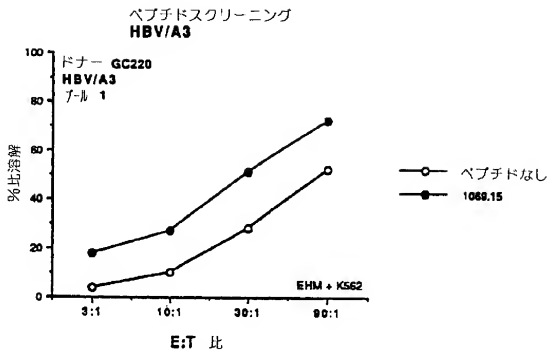
【図24】

Figure 24



【図25】

Figure 25



## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/US93/07421

## A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC(S) : A61K 39/00; C07K 7/06, 7/08

US CL : 424/88; 514/2; 530/300, 327, 328

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

## B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

U.S. : 424/88; 514/2; 530/300, 327, 328

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

## C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	J. Exp. Med., vol. 174, number 3, issued 01 September 1991, Romero, et al., "H2K-d-restricted antigenic peptides share a simple binding motif", pages 603-612, see especially the abstract.	1-20
Y	Nature, vol. 353, issued 26 September 1991, T. S. Jardetzky, et al., "Identification of self peptides bound to purified HLA-B27", pages 326-329, see entire document.	1-20
Y	Nature, vol. 351, issued 23 May 1991, K. Falk, et al., "Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules", pages 290-296, see abstract.	1-20

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C☐ See parent family annex.

\* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be part of prior art

"E" earlier document published on or after the international filing date

"L" document which may have been known or priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T"

later document published after the international filing date or priority date but not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y"

document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combinations being obvious to a person skilled in the art

"Z"

document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

01 November 1993

Date of mailing of the international search report

17 NOV 1993

Name and mailing address of the ISA/US  
Commissioner of Patents and Trademarks  
Box PCT  
Washington, D.C. 20231

Authorized officer

THOMAS CUNNINGHAM

Facsimile No. NOT APPLICABLE

Telephone No. (703) 308-0196

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (July 1992)\*



---

フロントページの続き

(81)指定国 EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AT, AU, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CZ, DE, DK, ES, FI, GB, HU, JP, KP, KR, KZ, LK, LU, MG, MN, MW, NL, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SK, UA, VN

(72)発明者 セット, アレッサンドロ  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 92037,  
ラ ジョラ, リンダ ロサ アベニユ  
5551

(72)発明者 セリス, エステバン  
アメリカ合衆国, カリフォルニア 92130,  
サンディエゴ, ランドフェア ロード  
13644



より一日あたり紙張消費のエネルギーを削減する。削減割合は、ここで急減  
削減を要する。

Yである関二級品を売って得る第一補償モナーフ；且びは

から成る数から選られ、

一方、別添図面第 2 図に示すように、それら適感フィードバックに対する調整

一人は、通過して、ラを突く。もう一人は、足で彼のペラカセフサメントを蹴る。

は日本の資源からアミノ酸誘導体カルボキシル末端を有する「ミノ酸配列」を用

佐藤・川口・小島共のEビトープを完全なノロウイルスで感染し、ここでも  
怪魚に予、フビ

(ii) 円錐エントロピーのアミノ酸配列から近位にあるD, E, A及びGの

17. 凡A—Gは国家は他国管下船舶先伐被害を賠償するための賠償担保物であ

〔1〕 後記：ビトープのナリノ木製アミノ酸肥料から生花の位置にある「S」

(ii) 前記エピソードの $\alpha$ ノ不成立ノ無状態から $\alpha$ の位置にある $\beta$ 、 $\beta$

第二演出モチーフ：  
 ながらあるが、ながらあるが、

13. 詳細な経路は、図 10 に示す通りである。

29. 前記エネトロフが戦後半期から示す読解に由来する。指示受け読解の要  
件に由来

しそで

から成る群から選にれ、

そして

ダノシの覆羽を食んで成り、無しの為めのベア子は無助感に落着いてない。

6. 前記項目の計算が適当な標準である。請求項4又は5記載の方法。

11. 前記無題作がⅢV、ⅢV、ⅢV 又はマツリア試料である、油ま油10.46g

13. 少なくとも1つのサブドメインを抽出する。抽出結果は、記述の方法。

III-4-A 1 分子に対する遷移ヘブイ・マラザメントの結合状態を決定する工程を含んで成る、商業用の装置の方法。

がDから成る群から選ばれる部一アミノ酸残基及び塩基サブ配列のヤルがとられ  
内殻にあるK, Y, R, H及びIから成る群から選ばれる部一アミノ酸残基を含む

22. 更に、  
前記エビトープラ含んで成るMは、ムシモチアザミをベースとした等価物；

刀について試験し、そして

明記ニヒトゾをかんてなるモチーフ極高ベアデの 重A・A分子に対する  
結合種類を決定。そして

24. 負圧型バブザドを製作する方法であつて、

きも、1)アミノ酸残基のエピトープを前記アミノ酸配列内で同定し、ここで「特

成る計から選ばれる第二基底を含んで成り；

—A—が利用頻数調査市販により露出され、その結果、影響を及ぼす。

解する特徴的な信号を発生する位でついで記録し、そして、  
 記録したテープに文字から特徴信号で特徴位置を記録する。家庭用ビデオの「見  
 入」機能のテープを再生して成る1又は複数のビデオプログラムを決定する。  
 1. 上述を繰り返す方法。

2. 再、1又は複数のビデオプログラムを再生して成る1又は複数のビデオプログラムを決定する。  
 3. 上述の方法を繰り返す方法。

4. 上述の方法を繰り返す方法。

5. 上述の方法を繰り返す方法。

6. 上述の方法を繰り返す方法。

7. 上述の方法を繰り返す方法。

8. 上述の方法を繰り返す方法。

9. 上述の方法を繰り返す方法。

10. 上述の方法を繰り返す方法。

11. 上述の方法を繰り返す方法。

12. 上述の方法を繰り返す方法。

13. 上述の方法を繰り返す方法。

14. 上述の方法を繰り返す方法。

15. 上述の方法を繰り返す方法。

16. 上述の方法を繰り返す方法。

17. 上述の方法を繰り返す方法。

18. 上述の方法を繰り返す方法。

19. 上述の方法を繰り返す方法。

20. 上述の方法を繰り返す方法。

21. 上述の方法を繰り返す方法。

22. 上述の方法を繰り返す方法。

23. 上述の方法を繰り返す方法。

24. 上述の方法を繰り返す方法。

25. 上述の方法を繰り返す方法。

26. 上述の方法を繰り返す方法。

27. 上述の方法を繰り返す方法。

28. 上述の方法を繰り返す方法。

29. 上述の方法を繰り返す方法。

30. 上述の方法を繰り返す方法。

31. 上述の方法を繰り返す方法。

32. 上述の方法を繰り返す方法。

33. 上述の方法を繰り返す方法。

34. 上述の方法を繰り返す方法。

35. 上述の方法を繰り返す方法。

36. 上述の方法を繰り返す方法。

37. 上述の方法を繰り返す方法。

38. 上述の方法を繰り返す方法。

39. 上述の方法を繰り返す方法。

40. 上述の方法を繰り返す方法。

41. 上述の方法を繰り返す方法。

42. 上述の方法を繰り返す方法。

43. 上述の方法を繰り返す方法。

44. 上述の方法を繰り返す方法。

45. 上述の方法を繰り返す方法。

46. 上述の方法を繰り返す方法。

47. 上述の方法を繰り返す方法。

48. 上述の方法を繰り返す方法。

49. 上述の方法を繰り返す方法。

50. 上述の方法を繰り返す方法。

51. 上述の方法を繰り返す方法。

52. 上述の方法を繰り返す方法。

53. 上述の方法を繰り返す方法。

54. 上述の方法を繰り返す方法。

55. 上述の方法を繰り返す方法。

56. 上述の方法を繰り返す方法。

57. 上述の方法を繰り返す方法。

58. 上述の方法を繰り返す方法。

59. 上述の方法を繰り返す方法。

60. 上述の方法を繰り返す方法。

61. 上述の方法を繰り返す方法。

62. 上述の方法を繰り返す方法。

63. 上述の方法を繰り返す方法。

64. 上述の方法を繰り返す方法。

65. 上述の方法を繰り返す方法。

66. 上述の方法を繰り返す方法。

67. 上述の方法を繰り返す方法。

68. 上述の方法を繰り返す方法。

69. 上述の方法を繰り返す方法。

70. 上述の方法を繰り返す方法。

71. 上述の方法を繰り返す方法。



、ここで当該構成要素が当該二ビットのシステム論理値から2倍に倍増に  
よる。すなわち、この場合の倍増の値は、 $2 \times 1 = 2$ 倍増の値である。二ビット  
のシステム論理値である。すなわち、 $2 \times 1 = 2$ 倍増の値である。二ビット  
のシステム論理値である。

ここで当該構成要素は、その二ビットのシステム論理値は、 $2 \times 1 = 2$ 倍増  
に對して、 $2 \times 1 = 2$ 倍増の値である。すなわち、 $2 \times 1 = 2$ 倍増の値である。  
倍増の値である。倍増の値である。

例、当該構成要素の二ビットのシステム論理値は、 $2 \times 1 = 2$ 倍増の値  
である。倍増の値である。倍増の値である。

例、当該構成要素の二ビットのシステム論理値は、 $2 \times 1 = 2$ 倍増の値  
である。倍増の値である。倍増の値である。